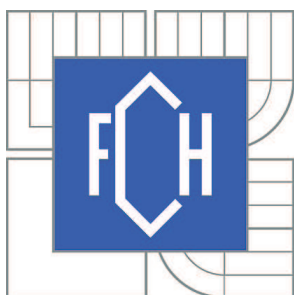


VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

# VYUŽITÍ MAGNETICKÝCH MIKROČÁSTIC PRO IZOLACI BAKTERIÁLNÍ DNA

THE USE OF MAGNETIC MICROPARTICLES FOR BACTERIAL DNA ISOLATION

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

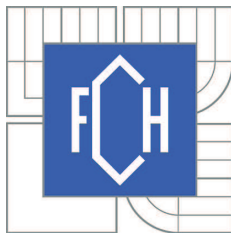
Bc. RADKA HRUDÍKOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. RNDr. ALENA ŠPANOVÁ, CSc.

BRNO 2012



Vysoké učení technické v Brně  
**Fakulta chemická**  
Purkyňova 464/118, 61200 Brno 12

## Zadání diplomové práce

Číslo diplomové práce:	<b>FCH-DIP0591/2011</b>	Akademický rok: <b>2011/2012</b>
Ústav:	Ústav chemie potravin a biotechnologií	
Student(ka):	<b>Bc. Radka Hrudíková</b>	
Studijní program:	Chemie a technologie potravin (N2901)	
Studijní obor:	Potravinářská chemie a biotechnologie (2901T010)	
Vedoucí práce	<b>doc. RNDr. Alena Španová, CSc.</b>	
Konzultanti:	doc. Ing. Bohuslav Rittich, CSc.	

### Název diplomové práce:

Využití magnetických mikročastic pro izolaci bakteriální DNA

### Zadání diplomové práce:

1. Vypracujte literární přehled k dané problematice
2. Popište použité experimentální metody
3. Zpracujte získané experimentální výsledky
4. Vyhodnoťte získané výsledky formou diskuse

### Termín odevzdání diplomové práce: 11.5.2012

Diplomová práce se odevzdává ve třech exemplářích na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu diplomové práce. Toto zadání je přílohou diplomové práce.

-----  
Bc. Radka Hrudíková  
Student(ka)

-----  
doc. RNDr. Alena Španová, CSc.  
Vedoucí práce

-----  
doc. Ing. Jiřina Omelková, CSc.  
Ředitel ústavu

V Brně, dne 15.1.2012

-----  
prof. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.  
Děkan fakulty

## ABSTRAKT

Práce byla zaměřena na testování dvou typů magnetických mikročastic funkcionalizovaných –COOH skupinami pro izolaci bakteriální DNA. Izolace byla provedena z hrubých lyzátů buněk připravených z čisté kultury *Lactobacillus paracassei* RL-10, v prostředí 2 M NaCl a 16% PEG 6000. Dále byl sledován vliv degradace RNA enzymem RNáza A na množství izolované DNA. Bylo zjištěno, že degradace RNA v hrubých lyzátech buněk měla vliv na množství izolované DNA. Množství izolované DNA záleželo na použitých mikročasticích. Větší množství DNA bylo izolováno pomocí částic s větším obsahem –COOH skupin. Nosiči byla izolována DNA amplifikovatelná v PCR. V další části práce byly testovány nosiče funkcionalizované –NH<sub>2</sub> skupinami při izolaci DNA s využitím elektrostatických sil. Bylo prokázáno, že pro vazbu DNA na nosič je vhodné prostředí s nižším pH.

## ABSTRACT

The aim of the work was testing of two types of magnetic mikrospheres functionalised with –COOH groups for the isolation of bacterial DNA. Isolation of DNA was carried out from crude lysates of cells prepared from pure culture of *Lactobacillus paracassei* RL-10 in the presence of binding buffer with 2 M NaCl and 16% PEG 6000. The influence of RNA degradation by enzyme RNase A on the amount of isolated DNA was investigated. It was estimated that RNA degradation affects the amount of DNA isolated. The amount of DNA depended on the type of microparticles. Higher amounts of DNA were isolated using particles with higher content of carboxyl groups. DNA applicable in PCR was isolated using both types of mikrospheres. In next part of the work, microparticles functionalised with –NH<sub>2</sub> groups were used to DNA isolation using electrostatic forces. It was shown that buffer with lower pH is suitable for DNA adsorption onto magnetic microparticles.

## KLÍČOVÁ SLOVA

Magnetické mikročastice, izolace bakteriální DNA, degradace RNA, polymerázová řetězová reakce

## KEY WORD

Magnetic microparticles, bacterial DNA isolation, RNA degradation, polymerase chain reaction

HRUDÍKOVÁ, R. *Využití magnetických mikročástic pro izolaci bakteriální DNA*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2012. 62 s. Vedoucí diplomové práce doc. RNDr. Alena Španová, CSc.

## PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

.....  
Podpis studenta

Chtěla bych především poděkovat doc. RNDr. Aleně Španové, CSc. za vedení a pomoc při vzniku této diplomové práce. Dále pak děkuji doc. Ing. Bohuslavu Rittichovi, CSc. za konzultace a rady, které mi pomohli při tvorbě této práce. A poděkování patří i Ing. Barboře Gregušové a Mgr. Kristýně Turkové, které mi svými radami a zkušenostmi práci v laboratoři značně ulehčili.

# OBSAH

<b>1 ÚVOD .....</b>	<b>8</b>
<b>2 TEORETICKÁ ČÁST .....</b>	<b>9</b>
<b>2.1 MIKROORGANISMY A POTRAVINY .....</b>	<b>9</b>
<b>2.2 MIKROORGANISMY V POTRAVINÁŘSKÉM PRŮMYSLU.....</b>	<b>9</b>
<b>2.3 BAKTERIE MLÉČNÉHO KVAŠENÍ .....</b>	<b>9</b>
2.3.1 Metabolismus bakterií mléčného kvašení .....	10
2.3.2 Bakterie mléčného kvašení v organismu.....	10
<b>2.4 IDENTIFIKACE BMK .....</b>	<b>12</b>
2.4.1 Kultivační metody .....	12
2.4.2 Nekultivační metody .....	12
<b>2.5 POLYMERÁZOVÁ ŘETĚZOVÁ REAKCE .....</b>	<b>12</b>
2.5.1 Kroky metody PCR .....	12
2.5.2 Komponenty PCR .....	14
2.5.2.1 DNA matrice pro PCR .....	14
2.5.2.2 Termostabilní DNA polymeráza .....	16
2.5.2.3 Primery a jejich návrh .....	16
2.5.3 Termocykler .....	16
<b>2.6 DETEKCE PRODUKTŮ PCR .....</b>	<b>17</b>
2.6.1 Detekce PCR produktů v konvenční PCR.....	17
2.6.2 Detekce PCR produktu v nekonvenční PCR (real-time PCR) .....	19
<b>2.7 IZOLACE BAKTERIÁLNÍ DNA.....</b>	<b>20</b>
2.7.1 Metoda fenolové extrakce .....	20
<b>2.8 MAGNETICKÉ MIKROČÁSTICE .....</b>	<b>20</b>
2.8.1 Vlastnosti magnetického nosiče .....	20
2.8.1.1 Paramagnetismus.....	21
2.8.1.2 Velikost mikročastic.....	21
2.8.1.3 Příprava mikročastic.....	21
2.8.1.4 Funkcionalizace povrchu mikročastic .....	21
2.8.2 Aplikace magnetických mikročastic .....	22
2.8.3 Metoda využívající magnetické nosiče .....	22
2.8.4 Reverzibilní adsorbce nukleových kyselin na nosič v prostředí s PEG 6000 ..	22
2.8.4.1 Kondenzace molekuly DNA .....	23
2.8.5 Reverzibilní adsorbce nukleových kyselin na nosič s využitím elektrostatických sil.....	23
2.8.6 Využití mikročastic pro izolaci DNA z komplexních vzorků potravin .....	23
<b>3 CÍL PRÁCE .....</b>	<b>25</b>
<b>4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....</b>	<b>26</b>

<b>4.1 MATERIÁL .....</b>	<b>26</b>
4.1.1 Bakteriální buňky .....	26
4.1.2 DNA pro testování mikročástic s –NH <sub>2</sub> skupinou .....	26
4.1.3 Charakteristika použitých magnetických nosičů.....	26
4.1.4 Chemikálie .....	26
4.1.5 Kultivační média .....	27
4.1.6 Roztoky pro lyzi bakteriálních buněk .....	27
4.1.7 Roztoky pro izolaci bakteriální DNA.....	28
4.1.7.1 Roztoky pro izolaci bakteriální DNA fenolovou extrakcí .....	28
4.1.7.2 Roztoky pro izolaci bakteriální DNA magnetickým nosičem .....	29
4.1.8 Roztoky pro agarózovou gelovou elektroforézu DNA .....	29
4.1.9 Přístroje a pomůcky.....	30
<b>4.2 METODY .....</b>	<b>30</b>
4.2.1 Kultivace bakteriálních buněk.....	30
4.2.2 Kontrola čistoty bakteriální kultury .....	30
4.2.3 Lyze bakteriálních buněk .....	31
4.2.4 Izolace bakteriální DNA fenolovou extrakcí .....	32
4.2.5 Srážení DNA ethanolem .....	32
4.2.6 Izolace DNA magnetickým nosičem.....	33
4.2.7 Podmínky izolace DNA pomocí elektrostatických sil .....	33
4.2.8 Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty DNA .....	34
4.2.8.1 Postup měření na NanoPhotometru.....	34
4.2.9 Ověření kvality izolované DNA metodou PCR .....	35
4.2.9.1 Postup pro přípravu směsi pro PCR. ....	35
4.2.9.2 PCR pro rod <i>Lactobacillus</i> .....	36
4.2.9.3 PCR pro doménu <i>Bacteria</i> .....	36
4.2.10 Agarózová gelová elektroforéza DNA.....	37
4.2.11 Stanovení citlivosti metody PCR .....	37
<b>5 VÝSLEDKY .....</b>	<b>38</b>
<b>5.1 PŘÍPRAVA HRUBÝCH LYZÁTŮ BUNĚK S A BEZ PŮSOBENÍ RNÁZY A .....</b>	<b>38</b>
<b>5.2 IZOLACE BAKTERIÁLNÍ DNA FENOLOVOU EXTRAkcÍ Z RŮZNÉHO MNOŽSTVÍ HRUBÝCH LYZÁTŮ BUNĚK.....</b>	<b>38</b>
5.2.1 Izolace DNA z 500 µl hrubého lyzátu.....	38
5.2.2 Izolace DNA z 100 µl hrubého lyzátu buněk .....	39
<b>5.3 IZOLACE DNA MAGNETICKÝMI NOSIČI FKOL 135OX A FH 46OX.....</b>	<b>39</b>
5.3.1 Izolace DNA magnetickým nosičem Fkol 135ox .....	39
5.3.2 Izolace DNA magnetickým nosičem FH 46ox .....	40
5.3.3 Grafické porovnání izolací DNA pomocí Fkol 135ox a FH 46ox .....	42
<b>5.4 POROVNÁNÍ POUŽITÝCH METOD IZOLACE DNA.....</b>	<b>42</b>
<b>5.5 CITLIVOST METODY PCR PRO ROD <i>LACTOBACILLUS</i>.....</b>	<b>43</b>
<b>5.6 CITLIVOST METODY PCR PRO DOMÉNU <i>BACTERIA</i> .....</b>	<b>44</b>
<b>5.7 OVĚŘENÍ IZOLACE DNA POMOCÍ AGARÓZOVÉ GELOVÉ ELEKTROFORÉZY .....</b>	<b>45</b>

<b>5.8</b>	<b>OVĚŘENÍ KVALITY IZOLOVANÉ DNA METODOU PCR PRO ROD <i>LACTOBACILLUS</i>.....</b>	<b>47</b>
<b>5.9</b>	<b>OVĚŘENÍ KVALITY IZOLOVANÉ DNA METODOU PCR PRO DOMÉNU <i>BACTERIA</i> .....</b>	<b>48</b>
<b>5.10</b>	<b>TESTOVÁNÍ IZOLACE DNA POMOCÍ ELEKTROSTATICKÝCH SIL .....</b>	<b>50</b>
5.10.1	Množství DNA navázané pomocí elektrostatických sil .....	51
5.10.1.1	Grafické porovnání množství navázané DNA na nosič .....	52
5.10.2	Eluce DNA izolované pomocí elektrostatických sil .....	52
<b>6</b>	<b>DISKUSE.....</b>	<b>53</b>
<b>6.1</b>	<b>IZOLACE DNA METODOU FENOLOVÉ EXTRAKCE .....</b>	<b>53</b>
<b>6.2</b>	<b>IZOLACI DNA MAGNETICKÝM NOSIČEM.....</b>	<b>53</b>
6.2.1	Izolace DNA magnetickým nosičem Fkol 135ox .....	53
6.2.2	Izolace DNA magnetickým nosičem FH 46ox .....	53
6.2.3	Grafické srovnání izolací magnetickými nosiči .....	53
6.2.4	Vliv degradace RNA .....	54
<b>6.3</b>	<b>POROVNÁNÍ METOD IZOLACE DNA.....</b>	<b>54</b>
<b>6.4</b>	<b>CITLIVOST METODY PCR .....</b>	<b>54</b>
<b>6.5</b>	<b>AGARÓZOVÁ GELOVÉ ELEKTROFORÉZA DNA .....</b>	<b>54</b>
<b>6.6</b>	<b>AGARÓZOVÁ GELOVÁ ELEKTROFORÉZA PRODUKTŮ PCR.....</b>	<b>55</b>
<b>6.7</b>	<b>IZOLACE DNA POMOCÍ ELEKTROSTATICKÝCH SIL .....</b>	<b>55</b>
<b>7</b>	<b>ZÁVĚR .....</b>	<b>56</b>
<b>8</b>	<b>SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ .....</b>	<b>57</b>
<b>9</b>	<b>SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ.....</b>	<b>61</b>
<b>10</b>	<b>PŘÍLOHY.....</b>	<b>62</b>

## 1 ÚVOD

Biotechnologické postupy provázejí život lidí už od pradávna. Mikroorganismy jsou důležitou součástí těchto procesů. Jejich primární funkce byla a dodnes je při přípravě některých typických potravin a nápojů. Dnes se využívají především v mlékárenském průmyslu, pivovarnictví, vinařství, pekárenství atd.

Mikroorganismy osídlují i lidské tělo, jejich výskyt je nejvýznamnější v gastrointestinálním traktu. Tyto druhy mají významnou funkci pro člověka. Podporují imunitní systém, napomáhají trávení, tvoří vitamín K a další významné látky.

Význam střevní mikroflóry podle nových studií stoupá a výživa je jeden z hlavních faktorů pro udržení dostatečné populace střevních mikroorganismů. Právě na mikroorganismy tvořící součást gastrointestinálního traktu jsou zaměřeny podpůrné probiotické a prebiotické potraviny a potravinové doplňky, které jsou spotřebitelem stále více žádány. S nárůstem používání probiotických kultur v potravinářském a farmaceutickém průmyslu se zvyšuje význam jejich kontroly. K ověřování přítomnosti a množství cílových bakteriálních buněk (probiotik) se využívají metody analýzy DNA.

Metody molekulární biologie umožňují analýzy dříve neproveditelné. Jsou to postupy založené na analýze DNA, případně dalších molekul. V dnešní době jsou tyto metody využívány v mnohých oborech a odvětvích jak vědy, tak i běžné průmyslové praxe, včetně potravinářství. Stále se hledají nové možnosti využití a stále se vyvíjejí nové postupy, které směřují k automatizaci a miniaturizaci postupů analýzy. Tato práce se zabývá vývojem nových postupů při izolaci DNA s využitím magnetických mikročástic.



## 2 TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Mikroorganismy a potraviny

Mikroorganismy pro přípravu potravin jsou využívány od starověku. V dobách dávno minulých nebylo používání bakteriálních kultur vědomé. Náhodně objevený postup byl opakován, aniž by tehdejší lidé věděli, proč se tak děje. Dobrým příkladem je příprava chleba, vína a dalších fermentovaných potravin. Postupem času a po zavedení přístrojového vybavení jako je mikroskop, byly výše uvedené děje vysvětleny a objasněny mikrobiologické příčiny žádoucích biotechnologických procesů. Dnes víme, že mikroorganismy nás provázejí celým životem a jsou všudypřítomné.

### 2.2 Mikroorganismy v potravinářském průmyslu

Z hlediska potravinářského průmyslu mohou mít mikroorganismy několik základních funkcí. Pozitivní vliv mají při výrobě fermentovaných potravinproduktů s probiotickými mikroorganismy a při přípravě potravin se speciálními sensorickými vlastnostmi. Při nežádoucí kontaminaci dochází k negativním změnám sensorických vlastností. Negativním projevem je hnití a plesnivění. V případě pomnožení patogenů v potravine, může dojít k ohrožení zdraví a života konzumenta [1].

Souhrnně přítomnost mikroorganismů je tedy v některých případech žádoucí, v jiných velmi nežádoucí. K eliminaci nežádoucí mikroflóry byly vyvinuty metody, specializované pro různé druhy potravin a hojně využívané k prodloužení údržnosti potravin.

### 2.3 Bakterie mléčného kvašení

Nejpoužívanějšími mikroorganismy v potravinářském průmyslu jsou bakterie mléčného kvašení (BMK). Mezi tyto bakterie patří kokovité a tyčinkovité bakterie rodů *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Lactobacillus*, *Enterococcus* a další. Rod *Bifidobacterium* patřící do vývojové větve aktinomycet je řazen mezi BMK díky fenotypické podobnosti (protože tvoří kyselinu mléčnou) [2].

Většinou se jedná o nepohyblivé, nesporulující, gram pozitivní tyčinky a koky. Jsou mezofilními organismy. Jejich hlavním využitím je fermentace substrátu (nejčastěji sacharidů) za fakultativně anaerobních, případně mikroaerofilních podmínek. Z důvodů jejich enzymového vybavení mohou fermentovat různé substráty jako maso, cereálie, zelenina, rostliny. Kvašením vzniká především kyselina mléčná, proto je proces nazýván mléčným kvašením [3].

Metabolickou produkcí kyseliny mléčné bakterie mléčného kvašení prodlužují trvanlivost potravin. Snižují pH a redoxpotenciál prostředí, tím znevýhodňují, nebo přímo potlačují (inhibují), růst nežádoucích mikroorganismů. Dalším možným způsobem inhibice je metabolická produkce antimikrobiálních látek. Jako zástupce je možné uvést druh *Lactobacillus acidophilus*, který produkuje široké spektrum antimikrobiálních látek stejně jako *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*, který produkuje nisin. Potlačují tím růst koliformních bakterií. Podobný účinek má i *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* [4].

V potravinářském průmyslu jsou při výrobě využívány hlavně čisté mlékařské kultury, startovací kultury, zákysy atd. Jedná se o speciální směsi mikroorganismů, k získání přesně daných vlastností konečného produktu (konzistence, chuť, vůně, vzhled).

### 2.3.1 Metabolismus bakterií mléčného kvašení

Metabolismem BMK nevzniká jen a výhradně kyselina mléčná. Podle druhu mikroorganismu mohou vznikat i jiné produkty, jako kyselina octová, oxid uhličitý, ethanol. V prvním případě se jedná o homofermentativní BMK a v druhém případě jde o heterofermentativní BMK. Schéma jejich metabolismu je na Obrázku 1.

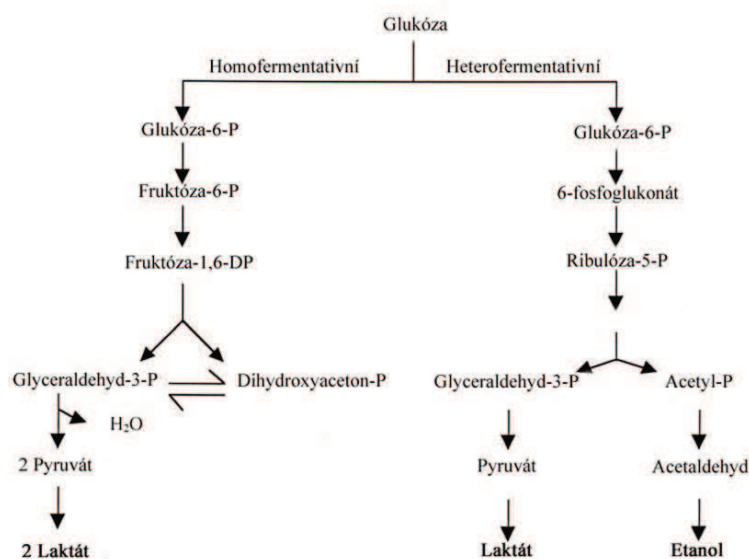
#### ▪ Homofermentativní BMK

Tyto bakterie fermentují substrát téměř výhradně na kyselinu mléčnou. Patří sem hlavně rody *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*. Metabolismus se skládá z části glykolýzy (anaerobní odbourávání substrátu na pyruvát) a pak dochází k samotnému homofermentativnímu kvašení (přeměna pyruvátu na kyselinu mléčnou) [2].

#### ▪ Heterofermentativní BMK

Tyto bakterie svým metabolismem produkují i jiné látky než je kyselina mléčná a to kyselinu octovou, ethanol, oxid uhličitý. Patří sem hlavně rody *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Leuconostoc*. Metabolismus těchto bakterií začíná stejně jako metabolismus předchozí skupiny glykolýzou (anaerobní odbourávání substrátu na pyruvát) dále je pyruvát metabolicky měněn na několik dalších produktů v ekvimolárním množství za vzniku kyseliny mléčné [2].

Obrázek 1: Metabolismus bakterií mléčného kvašení



Upraveno podle [2]

### 2.3.2 Bakterie mléčného kvašení v organismu

Bakteriální buňky nejsou prospěšné pouze v potravinářském či jiném průmyslu. Jsou rozšířeny v lidském i zvířecím organismu a zastávají tu velmi významné role. U člověka osidlují především gastrointestinální trakt, dále pak sliznici dutiny ústní, kůži a další části těla. Jejich role je v našem životě nezastupitelná. Potlačují růst patogenních organismů na sliznicích, v trávicím traktu zajišťují důležité rozkladné funkce, tvoří vitamín K a mají řadu dalších významných funkcí [5, 6].

Nově ovlivňují z velké části funkci našeho imunitního systému skrze trávení. Proto se vyrábějí a vyvíjí potravinové doplňky, slibující posílení a ozdravení střevní mikroflóry

a úpravu její skladby vhodnými BMK. Tyto přípravky se označují jako probiotické a prebiotické [6].

#### ▪ Probiotické přípravky a potraviny

Přípravky obsahující definované množství žádoucí bakteriální kultury, která při konzumaci dostatečného množství, pozitivně ovlivňuje zdraví člověka. V lékárnách jsou k dostání většinou ve formě tablet k použití perorálně. Přípravky mají definovanou skladbu a deklarují přežití mikroorganismů v takové míře, že lze prokázat pozitivní vliv probiotika na změnu skladby střevní mikroflóry. Další možností a stále více vyhledávanými produkty, jsou probiotické potraviny. Můžeme mezi ně zařadit například jogurty, jogurtové nápoje, zákysy atd. Mimo kultur potřebných pro výrobu potraviny, mají definovaný obsah probiotických bakterií, který je uveden na obalu [7].

K ověření přítomnosti dané kultury a jejího množství v preparátu, se využívají analytické metody, o nichž bude zmínka později. Nejčastěji využívané jsou rody *Lactobacillus* a *Bifidobacterium*. Přehled mikroorganismů považovaných za probiotické je uveden v Tabulce 1 [8].

#### ▪ Prebiotické přípravky

Přípravky tohoto typu se využívají k podpoře růstu stávající, či dodané mikroflóry v gastrointestinálním traktu. Jsou složeny z nestravitelných částí potravy (nejsou hydrolyzovány trávicími enzymy a nejsou vstřebávány do organismu). Jedná se o inulín, jeho deriváty a fruktooligosacharidy. Pro konzumenta je tato složka nevyužitelná, přechází do tlustého střeva v nezměněném stavu, kde selektivně stimuluje růst žádoucích bakterií (BMK). Zároveň tímto procesem potlačují růst patogenů. Prebiotické látky se nacházejí přirozeně v cibuli, pórků, čekance, česneku a dalších [8, 9].

Některá prebiotika obsahují místa pro navázání enteropatogenních toxinů (toxinů produkovaných patogenní mikroflórou) a toxiny jsou tak inaktivovány. Jedná se o kompetitivní inhibici [8].

Tabulka 1: Nejčastěji používané probiotické rody a druhy bakterií a kvasinek

Rod <i>Lactobacillus</i>	Rod <i>Bifidobacterium</i>	Kvasinky	Gram pozitivní koky	Gram negativní tyčinky
<i>L. acidophilus</i> <i>L. casei</i> <i>L. reuteri</i> <i>L. rhamnosus</i> <i>L. crispatus</i> <i>L. gasseri</i> <i>L. johnsonii</i> <i>L. paracasei</i>	<i>B. bifidum</i> <i>B. adolescentis</i> <i>B. animalis</i> <i>B. infantis</i> <i>B. lactis</i>	<i>Saccharomyces boulardii</i>	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremonis</i> <i>Streptococcus salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i> <i>Enterococcus faecium</i> <i>Streptococcus diacetylactis</i> <i>Streptococcus intermedius</i>	<i>Escherichia coli</i> (sérotyp O83:K24:H1)

Upraveno podle [6, 8]

## 2.4 Identifikace BMK

Jak je uvedeno výše, trendem poslední doby jsou probiotické potraviny. Bakteriální kultury prospěšné pro naše zdraví jsou stále více přidávány do běžných výrobků (jogurty, zákysy, kefiry). Testování údajů o bakteriálním složení výrobku na etiketách a obalech je dnes nutností. K těmto účelům existuje několik metod, které k zjištění požadovaných údajů lze použít.

### 2.4.1 Kultivační metody

Jedná se o metody, kdy se buňky získané z preparátu vysévají na tekutá, případně pevná, živná média. Zjišťuje se počet buněk na jednotku objemu a biochemickými testy se obvykle zjišťuje přítomnost buněk deklarované bakteriální kultury. Tato metoda je nepřesná a výsledky jsou nedostatečně prokazatelné. Obzvláště v určení druhu přítomné bakteriální kultury. Vzhled kolonií, jejich tvar, zabarvení a další, stejně jako biochemické testy, nejsou dostatečně specifické pro určení. Existuje mnoho druhů vykazujících stejné znaky jako ostatní BMK. Neexistuje selektivní médium dostačující k potvrzení pouze určitých zástupců BMK. Proto se od této metody ustupuje a v dnešní době převažují metody nekultivační [5].

### 2.4.2 Nekultivační metody

Nekultivační metoda je založena na analýze DNA vybrané bakteriální kultury. Tato analýza byla přelomem v identifikaci mikroorganismů. Obvykle spočívá v nabohacení bakteriálních buněk ze zkoumaného preparátu a následné izolaci DNA. DNA se dá z výrobku izolovat také přímo, bez nabohacování. Získaná DNA je amplifikována metodou polymerázové řetězové reakce (PCR) za použití primerů, kdy dochází k syntéze specifických amplikonů. Následně jsou amplikony separovány agarózovou gelovou elektroforézou spolu se standardem, obsahujícím fragmenty DNA o definované velikosti. Detekce probíhá na transiluminátoru pod UV světlem.

## 2.5 Polymerázová řetězová reakce

Polymerázová řetězová reakce (PCR – z anglického polymerase chain reaction) je metoda rychlé syntézy definovaného úseku DNA *in vitro*. Metoda PCR je revoluční metodou v molekulární biologii. Stejně jako klonování fragmentů DNA ve vektorech, umožnila řadu nových experimentálních postupů, které dříve nebyly proveditelné. Metoda se využívá například při detekci mikroorganismů a virů v potravinách, vodě, půdě a dalších matricích, při mapování a charakterizaci genů, v prenatalní diagnostice dědičných onemocnění, při izolaci určitého genu, při značení DNA inkorporací signálních nukleotidů. Neméně významným způsobem využití je určování paternity a identifikace jedince v kriminalistice [10].

### 2.5.1 Kroky metody PCR

Polymerázová řetězová reakce je velmi citlivá a proto je možné tuto metodu použít pro zjištění, nebo identifikaci velmi malého množství nukleové kyseliny ve vzorku. Základem metody je použití neporušeného úseku DNA jako matrice. Jak návrh oligonukleotidových primerů, tak také návrh podmínek reakce, vychází z obecné znalosti struktury a sekvence DNA. Definovaný úsek DNA, který má být namnožen, musí být ohraničen dvěma oligonukleotidovými primery. Primery jsou komplementární k 3' a 5' -koncovým sekvencím amplifikovaného úseku. Jejich vhodné navržení je nezbytným předpokladem úspěšného průběhu reakce [10].

Reakce umožňuje až  $10^6$  pomnožení úseků DNA v průběhu 2 – 3 hodin. Maximální délka úseku pro amplifikaci je v konvenční PCR asi 1 000 nukleotidů. Proces PCR zahrnuje tyto kroky: [10]

- Denaturace DNA matrice

DNA, která má být amplifikována je denaturována zahřátím tak, aby došlo k oddělení řetězců matrice. Vznikají jednořetězcové molekuly templátu. Reakce probíhá při teplotě, která je asi 94 – 98°C.

- Navázání primerů na komplementární sekvence

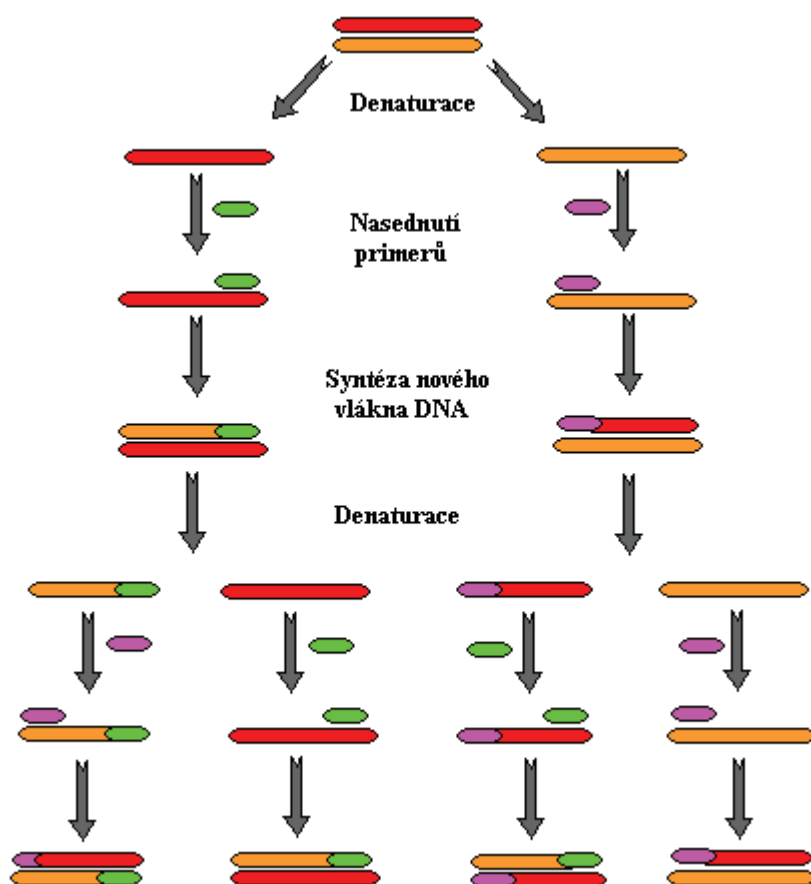
Dva primery, komplementární k hraničním úsekům cílové DNA která má být amplifikována, se naváží na DNA matici podle specifické sekvence. Vazba je podmíněna ochlazením směsi na 50 – 60°C. Potom nasedá na dvouvláknový úsek DNA polymeráza

- Syntéza nového vlákna termostabilní DNA polymerázou

Termostabilní DNA polymeráza katalyzuje syntézu nového řetězce DNA ve směru  $5' \rightarrow 3'$  podle přítomné matrice. Jako stavební kameny slouží směs deoxynukleotidů. Směs je inkubována po dobu reakce při 70 – 80°C podle použité DNA polymerázy.

Cyklus se opakuje podle potřeby a podle nastaveného programu na cykleru. Nejčastěji je počet opakování 30. Nově vzniklé řetězce slouží jako templáty pro syntézu dalších vláken. Dochází k exponenciálnímu nárůstu produktů PCR (amplikonů), kde počet cyklů určuje počet konečných amplikonů. Schéma průběhu PCR je uvedeno na Obrázku 2.

Obrázek 2: Schéma kroků PCR a znázornění exponenciálního nárůstu produktů.



Upraveno podle [11]

## 2.5.2 Komponenty PCR

Metoda PCR vyžaduje specifické komponenty pro přípravu směsi pro PCR. Jedná se o směs látek, potřebných k vytvoření nového vlákna DNA. Základním stavebním kamenem jsou deoxynukleotidy (dNTP). Z těchto je tvořeno nové vlákno. Dále je směs složena z pufru pro PCR s ionty  $Mg^{2+}$ , primerů, termostabilní DNA polymerázy, DNA matrice a objem je doplněn na konečnou hodnotu redestilovanou PCR vodou [10].

### 2.5.2.1 DNA matrice pro PCR

Jako matrice pro PCR může být použita jakákoliv DNA. DNA je tvořena dvěma komplementárními řetězci. Řetězce jsou spojeny vodíkovými můstky mezi nukleotidovými bázemi (A, G, C, T). Lineární sekvence těchto bází představuje genetický kód. Tři po sobě následující báze určují jednu aminokyselinu [12].

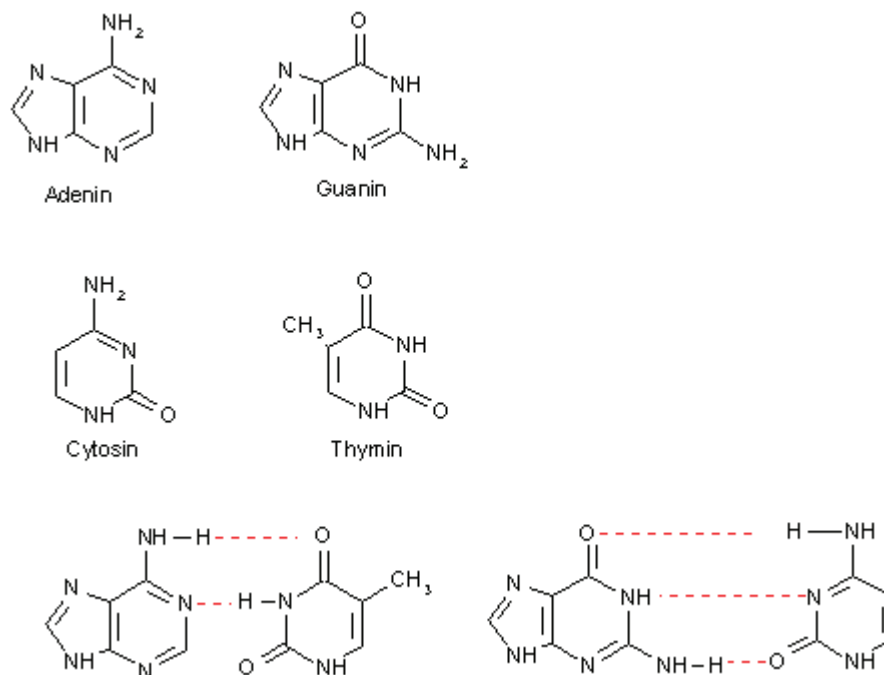
Základními stavebními jednotkami DNA jsou sacharid ribóza a fosfodiesterovou vazbou navázané báze. Báze mohou být odvozeny od purinu (adenin, guanin), nebo od pyrimidinu (thymin, cytosin) [12].

Obě vlákna jsou tvořena polynukleotidovými řetězci. Báze (A-T, G-C) jsou orientovány do středu a fosfosacharidové řetězce tvoří vnější kostru dvoušroubovice. Toto uspořádání minimalizuje odpuzivé síly z negativně nabitých fosfátových skupin. Díky těmto skupinám vykazuje molekula DNA záporný náboj. Komplementární párování bází pomocí vodíkových můstků je silou, která drží molekulu pohromadě [12].



Řetězce jsou orientovány antiparalelně. Orientace udává to, že fosfát spojuje 5'uhlík jedné deoxyribózy s 3'uhlíkem dalšího sacharidu. DNA je v buňkách *in vitro* syntetizována vždy ve směru 5' → 3', tato orientace se zachovává při zápisu sekvencí. Chemické vzorce bází jsou znázorněny na Obrázku 3 [13].

Obrázek 3: Chemický vzorec bází vyskytujících se v DNA a označení vzniku vodíkových můstků mezi nimi.



Upraveno dle [14]

Působením vysoké teploty dochází k přerušení vodíkových můstků. Nativní struktura se rozpadne a oba řetězce se oddělí (zaujmají konformaci náhodného klubka). K denaturaci může dojít i působením jiných vlivů než je vysoká teplota, například v alkalickém prostředí dochází ke stejnému efektu [10].

Při denaturaci DNA dochází k tzv. hyperchromnímu efektu. Při přerušení vodíkových můstků dochází ke zvýšení absorpce ultrafialového světla. Přejít mezi nativní formou a denaturovaným stavem se sleduje nejčastěji měřením UV – absorpčního spektra při vlnové délce 260 nm. Denaturace je kooperativní proces, k hyperchromnímu posunu dochází jen v úzkém intervalu teplot [10].

Stabilita molekuly DNA a teplota při které dochází k denaturaci je závislá především na podílu obsahu guaninu a cytosinu. S molárním poměrem těchto dvou bází roste teplota nutná k denaturaci. Tento fakt souvisí s počtem vodíkových můstků mezi bázemi. Na rozdíl od adeninu s thyminem, které mezi sebou tvoří dvě vodíkové vazby, guanin s cytosinem tvoří tři vodíkové vazby. To zvyšuje teplotu tání molekuly a tím tedy i teplotu, při které dochází k denaturaci. Teplota tání  $T_m$  je definována jako teplota, při které dochází k denaturaci u 50% molekul DNA. Dalšími faktory ovlivňující teplotu tání jsou pH, iontová síla roztoku, povaha rozpouštědla a další [15].

### 2.5.2.2 Termostabilní DNA polymeráza

Protože na začátku každého cyklu se denaturuje templátová DNA vysokou teplotou, která působí stejně i na enzymy, musí se při PCR používat tzv. termostabilní DNA polymerázy. Tyto enzymy pocházejí z termofilních bakterií, žijících v extrémních podmínkách (v horkých pramenech). Jejich proteinová struktura je evolucí uzpůsobena tak, že odolává po určitou dobu teplotám kolem 95°C. Tím je zajištěna jejich dostatečná aktivita po celou dobu amplifikace. Nejčastěji se pro PCR používá tzv. *Taq* – polymeráza, izolovaná z bakterie *Thermus aquaticus*. Její teplotní optimum je 75°C a poločas inaktivace *Taq* – polymerázy je přibližně 40 minut při 95°C. Tento enzym má pouze 5' → 3' polymerázovou aktivitu, tedy není schopen opravovat chyby vzniklé při replikaci DNA. Dnes používané termostabilní polymerázy jsou dále vylepšeny metodami genových manipulací tak, aby byly ještě odolnější vůči teplotě a lépe vyhovovaly svému použití v PCR [13].

### 2.5.2.3 Primery a jejich návrh

Pro každou PCR, která má za cíl amplifikovat konkrétní úsek templátové DNA, je potřeba navrhnout vhodný pár primerů. Při návrhu primerů se musí zajistit, aby oba primery nasedly při stejné teplotě jen na přesně komplementární sekvenci v templátové DNA. Kdyby nasedaly nejen na přesně komplementární sekvence, tedy i jinde v templátové DNA, nedošlo by k efektivní amplifikaci zvoleného úseku DNA. Proto musejí mít oba primery shodnou, nebo téměř shodnou teplotu tání [10].

Teplotu tání konkrétní sekvence určitého primeru lze určit buď výpočtem, nebo experimentálně. Vlastní teplota nasedání primerů musí být o něco nižší, než teplota tání. Pokud bychom použili přímo teplotu tání, bylo by nasednutí nestabilní. Konkrétní použitou teplotu pro hybridizaci primerů je často nutné určit experimentálně (optimalizovat podmínky reakce) [10].

Kromě požadavku na shodnou teplotu tání musí konkrétní pár primerů splňovat i další požadavky. Nesmí tvořit dimery a vlásenky. Dimer vzniká spárováním dvou primerů navzájem a příčinou jeho vzniku je delší komplementární úsek v sekvenci obou primerů. Pokud je dimer příliš stabilní, může jeho tvorba převážet nad hybridizací primerů s templátovou DNA a PCR neproběhne [13].

Vlásenky vznikají vzájemným spárováním konců stejného primeru navzájem. Protože vznik vlásenky může vyřadit jeden z primerů z nasedání na templátové vlákno, má proces stejné následky jako vznik dimerů – PCR neproběhne. Vhodné je využití různých typů softwarů, které umožňují navrhnout nejvhodnější primery pro amplifikaci sekvence [13].

## 2.5.3 Termocykler

Cyklické změny teplot reakční směsi jsou řízeny automaticky pomocí tzv. termocyklieru. Jedná se o programovatelný termostat, který je schopen přechodu mezi jednotlivými teplotami. Hlavním požadavkem je přesnost a rychlost přechodu. V současné době existuje celá řada výrobců a typů přístrojů s různými druhy zahřívání a chlazení. Ukázka termocyklieru je na Obrázku 4.

Zkumavky s reakční směsí jsou v termocyklieru uloženy v kovovém bloku, jehož teplota je řízena podle programu, nastaveného uživatelem. Reakční směs je podobně jako u jiných biochemických reakcí připravena v mikrozukmavce. Odlišnost spočívá v tom, že mikrozukmavka musí být tenkostěnná, aby umožňovala rychlé změny teplot ve směsi pro PCR.



Obvyklé je také sestavování reakční směsi tzv. na ledu. Mikrozkušavka je stále chlazená na teplotu mírně nad 0 °C, aby se zabránilo předčasné aktivitě *Taq* – polymerázy. Při laboratorní teplotě totiž mohou primery nespecificky nasednout na místa, která neodpovídají zcela jejich sekvenci a *Taq* – polymeráza může zahájit replikaci. Reakční směs by tak mohla být hned zpočátku obohacena o nespecifické produkty PCR, které by v pozdějších krocích snižovaly účinnost reakce, nebo by vedly ke vzniku zcela odlišných produktů [13].

*Obrázek 4: Obrázek termocykleru*



Upraveno dle [16]

## **2.6 Detekce produktů PCR**

V této kapitole jsou uvedeny dva způsoby detekce produktů PCR, které se využívají k vyhodnocování výsledků provedené analýzy.

### **2.6.1 Detekce PCR produktů v konvenční PCR**

Elektroforéza obecně patří mezi elektromigrační separační metody. Principem těchto metod je pohyb nabitých částic (molekul) v elektrickém poli, které je tvořeno vkládáním konstantního stejnosměrného napětí mezi elektrody. Částice mají různou pohyblivost a tato vlastnost se využívá k jejich separaci [17].

Velikost separovaných částic může být různá, od iontů přes velké makromolekuly až po koloidní částice a částice suspenzí či emulzí. Metoda se využívá hlavně k separaci vzorků biologického původu [17].

Elektroforéza v agarózovém či v polyakrylamidovém gelu se využívá k identifikaci fragmentů DNA získaných pomocí metody PCR (amplikony, produkty PCR) [18]. Amplikony jsou děleny v elektrickém poli v závislosti na jejich velikosti. Podmínky pro dělení fragmentů v různých rozmezích molekulových hmotností se zajišťují volbou vhodného

gelu a jeho koncentrace. Koncentrace gelu podle molekulových hmotností DNA fragmentů jsou uvedeny v Tabulce 2 [10].

*Tabulka 2: Interval molekulových hmotností fragmentů DNA separovaných v agarózovém gelu příslušné koncentrace.*

<b>Koncentrace agarózy v gelu [%]</b>	<b>Interval molekulových hmotností lineárních molekul DNA [kb*]</b>
0,3	5 – 60
0,6	1 – 20
0,7	0,8 – 10
0,9	0,5 – 7
1,2	0,4 – 6
1,5	0,2 – 3
2,0	0,1 – 2

\* kb (kilobáze) = označení počtu nukleotidů

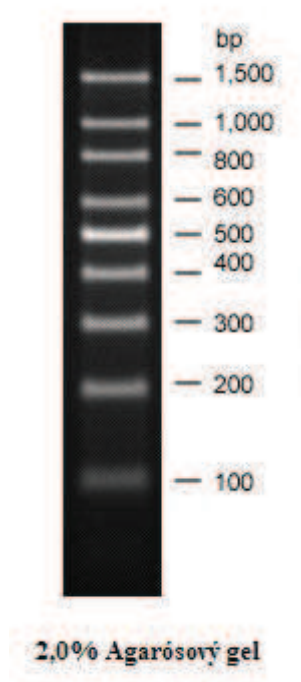
Upraveno dle [10]

Vzorky DNA jsou aplikovány na gel do komůrek a děleny za vhodného napětí po dobu nutnou pro dobré rozdělení fragmentů. Pro dosažení optimálního rozdělení se udává napětí 5V/cm (5V na 1 cm vzdálenosti mezi elektrodami).

Po rozdělení je gel barven ethidium bromidem. Ethidium bromid je interkalační činidlo, které se váže mezi dvojvlákna DNA a fluoreskuje po ozáření UV světlem o vlnové délce 260 – 360 nm. Komplex DNA a barviva je vizualizován v UV světle na transiluminátoru. Dokumentace gelů je prováděna digitálním fotoaparátem [17].

Pro stanovení velikosti jednotlivých PCR produktů metoda využívá markery molekulových hmotností. Jsou to komerčně dostupné směsi fragmentů DNA o definované velikosti. Tvoří tzv. žebříček. Porovnáním polohy získaných produktů PCR s odpovídajícím fragmentem markeru můžeme určit velikost. Velikost fragmentů se běžně udává jako počet párů bází – bp (z anglického „base pair“). Ukázka takového žebříčku fragmentů DNA je na Obrázku 5 [10].

*Obrázek 5: Standard 100 bp (žebříček fragmentů) DNA od 1 500 bp do 100 bp, který je rozdělen na 2,0 % agarózovém gelu.*



Upraveno dle [10]

### **2.6.2 Detekce PCR produktu v nekonvenční PCR (real-time PCR)**

Množství produktu, vytvořeného amplifikací, závisí v každé PCR na množství templátové DNA, která je přidána do reakce. Reakce probíhá kvantitativně. Přibližné určení množství produktu je možné posouzením intenzity pásu, který se objeví po detekci PCR produktu na gelu. Přesné určení tohoto množství je možné pomocí nejnovější, kvantitativní PCR, například s využitím sondy označené fluorescenčním barvivem [10].

Tato sonda musí být navržena tak, aby hybridizovala s templátovou DNA za stejných podmínek jako primery, a to tak, že nasedne na templátovou DNA v místě mezi místy nasednutí obou protisměrně orientovaných primerů. DNA polymeráza, která provádí replikaci od 3' konce primeru, se přiblíží při syntéze komplementárního vlákna k sondě. Používá se DNA polymeráza, která kromě své schopnosti syntetizovat komplementární vlákno má také exonukleázovou aktivitu, díky které může odbourat nasedlou sondu [19].

Při odbourávání se uvolní jednotlivé nukleotidy sondy, z nichž některé jsou označeny fluorescenčním barvivem. Pro tento typ sond se přitom používá fluorescenční barvivo, které není schopné fluorescence, dokud je vázáno ve struktuře sondy. Jakmile se ale uvolní do roztoku, tak začne fluoreskovat.

V průběhu PCR dochází k postupnému uvolňování molekul fluorescenčního barviva, takže roste fluorescence reakční směsi. Tento nárůst je přímo úměrný množství produktu, který v reakci vzniká. Speciální termocyklery, určené pro kvantitativní PCR v reálném čase, v průběhu PCR ozařují vzorek excitačním zářením, které vybudí fluorescenci uvolněného barviva. Tuto fluorescenci přístroj po každém cyklu změří a výsledek předá řídicímu softwaru, který zobrazuje průběžně množství uvolněné fluorescence, které odpovídá množství vzniklého produktu [10].

Výsledek reakce tak známe často dříve, než proběhnou všechny cykly. Kromě tohoto urychlení je tato technika hlavně výhodná tam, kde potřebujeme znát přesné množství vstupní templátové DNA. Dále se dá využít při sledování exprese genů pomocí tzv. reverzně transkripční polymerázové řetězové reakce (RT-PCR) a v dalších aplikacích [13].

## **2.7 Izolace bakteriální DNA**

Identifikaci BMK analýzou DNA za využití polymerázové řetězové reakce (PCR) je významným diagnostickým prostředkem. Hlavním požadavkem pro analýzu je izolace DNA v dostačujícím množství a především v kvalitě vhodné pro PCR. Izolace probíhá různými způsoby a postupy. Hledají se alternativní metody izolace, které budou k izolované DNA šetrnější a zaručí tím větší přesnost a prokazatelnost výsledků. Takovou metodou je izolace pomocí magnetického nosiče.

### **2.7.1 Metoda fenolové extrakce**

Pro izolaci kontrolní DNA byla použita metoda fenolové extrakce. Fenolová extrakce DNA je separační metoda využívající organická rozpouštědla. Jejím principem je rozdělení látek ve dvou vzájemně nemísitelných fázích. Tato metoda se využívá pro izolaci DNA z komplexních vzorků, nebo z hrubých lyzátů buněk čisté bakteriální kultury. Extrakce je založena na chemických vlastnostech použitých komponent. Biomakromolekula DNA je nerozpustná v organických rozpouštědlech a proto se pro tuto metodu využívá dvoufázového vodného systému, jedna fáze je organická a druhá fáze vodná.

Žádoucí je izolace v nativní a biologicky aktivní formě, což fenolová extrakce umožňuje. Použitá organická rozpouštědla (fenol, chloroform) jsou však toxická. Proto se hledají nové cesty pro jednoduchou izolaci DNA z komplexních vzorků. Touto jednoduchou metodou je využití magnetických nosičů pro izolaci DNA.

## **2.8 Magnetické mikročástice**

Magnetické separační techniky nacházejí využití v mnohých biotechnologických aplikacích. Poprvé byla magnetická separace popsána v literatuře v roce 1792 Williemem Fullartonem [20]. Magnetické částice jsou využívaným nástrojem magnetické separace v aplikacích jako jsou imobilizace proteinů, enzymů a jiných bioaktivních látek, dále pak v biomedicínské analytice a biotechnologických aplikacích [21].

Magnetické mikročástice jsou tvořeny anorganickým jádrem, které je nositelem magnetických vlastností. Jádro je tvořeno magnetickým materiálem o průměru menším než 30 nm a je pokryto organickou polymerní maticí, aby nedocházelo k přímé interakci izolované látky s jádrem (chrání před nespecifickými interakcemi). Magnetické vlastnosti jsou určeny materiálem, ze kterého je nosič vyroben. Jeho výběr závisí na požadovaných vlastnostech konečného nosiče.

### **2.8.1 Vlastnosti magnetického nosiče**

Magnetické nosiče mají uplatnění v mnoha odvětvích vědy. Od účelu jejich použití se odvíjí také jejich vlastnosti. Základní vlastností, vyplývající už z názvu, je magnetismus. Přesněji řečeno superparamagnetismus. Dále možnost funkcionalizace jejich povrchu a velikost částic, která je spjata s jejich přípravou.

### **2.8.1.1 Paramagnetismus**

Tato vlastnost je založena na magnetických vlastnostech, které částice vykazují pouze v přítomnosti vnějšího magnetického pole. Pokud se v blízkosti částic nevyskytuje magnetické pole, nedochází k jejich nežádoucí agregaci. Zbytkový magnetismus vykazují částice jen zřídka [22].

Paramagnetické vlastnosti má několik druhů materiálů. Nejvíce vyhovující materiály jsou některé oxidy železa, jako je magnetit  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  ( $\text{FeO} \cdot \text{Fe}_2\text{O}_3$ ) a maghemit  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ . Projevují se silnou magnetizací. Magnetit obsahuje ve své mřížce ionty železa ve formě  $\text{Fe}^{2+}$  a  $\text{Fe}^{3+}$ . Maghemit obsahuje v mřížce pouze ionty ve formě  $\text{Fe}^{3+}$  [22].

Vhodné vlastnosti mají i sloučeniny jiných prvků jako je chrom, kobalt, nikl a další. Jejich použití při izolaci analytů ze vzorů lidského původu je omezené vzhledem k jejich toxicitě [23, 24].

### **2.8.1.2 Velikost mikročástic**

Dalším parametrem nosiče je velikost. Pokud se jedná o nanočástice, pohybuje se jejich velikost v rozmezí 10 – 20 nm, větší nosiče jsou označovány jako mikročástice a jejich velikost se pohybuje v rozmezí 0,1 – 100  $\mu\text{m}$ . Velikost má přímý vliv na magnetické vlastnosti. Příliš malé částice přestávají reagovat na vnější magnetické pole a ztrácejí svou funkci [25].

V praxi musí být optimalizována velikost částice, aby její vlastnosti byly pro daný účel co nejprínosnější. Hledá se kompromis mezi dostatečnou magnetičností a velikostí aktivního povrchu nosiče [26].

### **2.8.1.3 Příprava mikročástic**

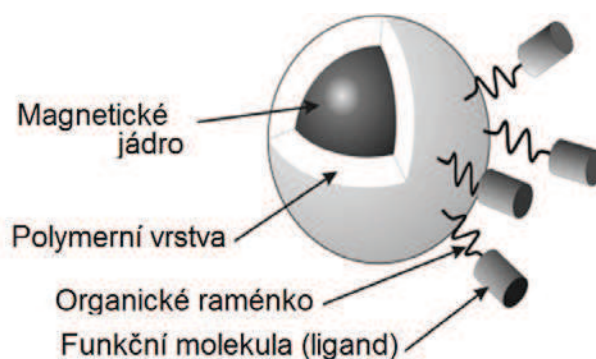
Příprava a syntéza magnetických částic je založena na fyzikálních metodách. Nejvíce rozšířenou přípravou magnetických mikročástic pro biotechnologické aplikace je příprava koprecipitací. Existují dvě metody přípravy částic  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  a  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  v roztoku [27]. V prvním případě je roztok hydroxidu železnatého oxidován různými oxidačními činidly [28]. V druhém případě dochází ke koprecipitaci iontů  $\text{Fe}^{2+}$  a  $\text{Fe}^{3+}$  z roztoků solí za přídavku báze [29]. Velikost částic je ovlivněna druhem použité soli, poměrem mezi  $\text{Fe}^{2+}$  a  $\text{Fe}^{3+}$ , iontovou silou a precipitačním médiem.

### **2.8.1.4 Funkcionalizace povrchu mikročástic**

Organická polymerní matrice musí být vůči analytu inertní, umožňovat úpravy povrchu zaváděním funkčních skupin, které jsou využívány k následné imobilizaci ligandů a izolaci analytu. Vrstvy magnetického nosiče a znázornění funkčních skupin je uvedeno na Obrázku 6.

Aby bylo možné vázat analyty na povrch magnetického nosiče, je třeba upravit povrch jádra. K této úpravě se nejčastěji používají přírodní, nebo syntetické polymery. V případě potřeby lze použít i organické sloučeniny, nebo anorganické materiály. Vzniklá vrstva chrání magnetické jádro před nespecifickými reakcemi, musí být biokompatibilní, stálá, nesmí probíhat interakce mezi samotnými částicemi nosiče. Vrstva polymeru musí být dobře modifikovatelná, aby mohlo dojít k imobilizaci analytu [30].

Obrázek 6: Názorná ukázka stavby magnetického nosiče



Upraveno dle [25]

### 2.8.2 Aplikace magnetických mikročastic

Aplikace magnetických mikročastic je velmi jednoduché a časově nenáročné. Využívá se vnějšího magnetického pole (magnetu) pro jednoduchou, efektivní a účinnou separaci částic z komplexního vzorku, nebo z hrubého lyzátu buněk. Separace a izolace probíhá v několika krocích uvedených na Obrázku 7 [31].

Použití magnetických mikročastic pro izolaci nukleových kyselin v akreditovaných laboratořích je již v některých případech zavedeno. Nenáročnost použití částic umožňuje automatizaci a zavedení do laboratorní praxe ve větším než výzkumném měřítku [31].

Obrázek 7: Aplikace magnetických mikročastic



Upraveno dle [31]

### 2.8.3 Metoda využívající magnetické nosiče

Tato metoda využívá reversibilní adsorpce DNA na nosič. Po adsorpci DNA na nosič dochází k její eluci do TE pufru. DNA lze tímto způsobem izolovat v kvalitě vhodné pro PCR a další molekulárně genetické metody. Magnetické částice s navázanou DNA lze ze směsi snadno separovat pomocí magnetu. K reversibilní adsorpci DNA na nosič dochází v přítomnosti vysoké koncentrace PEG 6000 a NaCl [27].

### 2.8.4 Reverzibilní adsorbce nukleových kyselin na nosič v prostředí s PEG 6000

Polyethylenglykol (PEG) je polymerní látka. V přítomnosti chloridu sodného způsobuje dehydrataci molekuly DNA. Při nízké koncentraci chloridu sodného je DNA přítomna v uvolněné formě, při zvýšení koncentrace dochází ke srážení makromolekul a vzniku kulovitě – spirálovitého tvaru.



V tomto stavu jsou makromolekuly DNA schopny interagovat s modifikovaným hydrofilním povrchem magnetického nosiče, obsahujícím záporně nabitou funkční skupinu (karboxylová skupina -COOH). DNA se z nosiče uvolňuje do vhodného pufru [32].

#### **2.8.4.1 Kondenzace molekuly DNA**

Vazba nukleových kyselin na nosič je podmíněna změnou konformace makromolekuly. Musí dojít ke kondenzaci DNA a vytvoření globulárního stavu, který umožňuje adsorpci na nosič. Kondenzace je podmíněna přítomností polyethylenglykolu (PEG) a chloridu sodného (NaCl). Kondenzace a dekonenzace jsou dva procesy umožňující přecházení molekuly DNA z kompaktního stavu do uvolněného stavu a naopak [12].

Kondenzace je obvykle definována jako zhroucení rozvinutého (hydratovaného) DNA dvouřetězce do jedné, nebo několika kompaktních molekul [33].

„*In vitro*“ při volné difúzi v roztoku je molekula DNA v uvolněném rozvinutém stavu. V tomto případě lze kondenzaci vyvolat vnějším zásahem. Efektu kondenzace můžeme dosáhnout například za pomoci osmotického tlaku, který vytvoříme neutrálním polymerem, nebo přidavkem soli. Typickým příkladem neutrálního polymeru je polyethylenglykol za přítomnosti  $\text{Na}^+$  ligandů (přídavek NaCl). Samostatné působení  $\text{Na}^+$  není dostačující, proto se využívá úpravy osmotického tlaku působením právě neutrálním polymerem (PEG). Mechanismus procesu reverzní adsorpce není zcela objasněn – proto je předmětem mnoha studií [33].

#### **2.8.5 Reverzibilní adsorbce nukleových kyselin na nosič s využitím elektrostatických sil**

Pro využití elektrostatických sil pro adsorpci DNA na nosič musí být povrch magnetického nosiče funkcionalizován skupinami s opačným nábojem, než má molekula DNA. Používá se k tomu například zavedení  $-\text{NH}_2$  skupiny. Tato skupina je schopna protonací vytvořit kladný náboj a tak elektrostaticky reagovat se záporně nabitou molekulou DNA [34].

Vliv pH, teploty a iontové síly roztoku na adsorpci a desorpci DNA z částic je stále intenzivně studován. Bylo zjištěno, že adsorpce a desorpce závisí především na elektrostatických interakcích mezi kladně nabitými magnetickými částicemi a záporně nabitou molekulou DNA [34].

Adsorpce DNA na magnetický nosič je podmíněna několika faktory. DNA musí difundovat z reakčního roztoku k povrchu magnetické mikročástice. Důležitým faktorem je rovnováha mezi adsorpcí a desorpcí molekul na nosič. A v neposlední řadě je podstatné brát v úvahu afinitu dalších molekul (mimo nukleových kyselin) k nosiči. Elektrostatické interakce by měly být dominantní oproti dalším možným reakcím ve směsi, jako jsou například hydrofobní interakce [34].

#### **2.8.6 Využití mikročástic pro izolaci DNA z komplexních vzorků potravin**

Komplexním vzorkem potravin jsou reálné vzorky potravin, obsahující i látky, které mohou interferovat v PCR. Práce s komplexním vzorkem je složitější než s čistou bakteriální kulturou. Žádoucí je čistota a kvalita DNA, vhodná pro provedení analýzy metodou PCR. Toto není u komplexních vzorků běžnými metodami snadno dosahováno. Do procesu je třeba zařazovat další purifikační kroky, které vedou ke snížení výtěžku, případně i ke snížení kvality DNA. Využití magnetických nosičů pro izolaci DNA z takto komplexních vzorků je dobrým řešením problému. Některé komerčně dostupné nosiče jsou v praxi již využívány.

Jsou však vyvíjeny stále nové nosiče pro zcela konkrétní aplikace. Jejich testování a studiu je věnována velká pozornost.

Při použití magnetického nosiče se DNA, uvolněná z buněk přítomných ve vzorku, reverzibilně váže na modifikovaný povrch polymeru, kterým je obaleno magnetické jádro. V procesu se po navázání nosič promývá a tím se odstraňují zbytky nežádoucích příměsí, které by mohly způsobit interference v PCR. Největší výhodou této metody je čistota a vysoká kvalita izolované DNA. Při dobře optimalizovaném procesu a vhodně zvolených nosičích, můžeme získat dostatečné množství DNA v kvalitě vhodné pro PCR a analýza DNA probíhá bez dalších komplikací.



### 3 CÍL PRÁCE

Cílem této práce bylo testování dvou typů magnetických hydrofilních nosičů na bázi HEMA pro izolaci bakteriální DNA. Nosiče byly funkcionalizovány na povrchu polymeru skupinami  $-\text{COOH}$  a nebo  $-\text{NH}_2$ . Byl sledován vliv degradace RNA enzymem RNázou A na množství DNA izolované z hrubých lyzátů buněk.

Nosiče byly využity pro izolaci DNA z hrubých lyzátů buněk čisté bakteriální kultury.

- 1) v prostředí 16 % PEG 6000 a NaCl
- 2) s využitím elektrostatických sil

## 4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 4.1 Materiál

#### 4.1.1 Bakteriální buňky

Pro kultivaci byly použity buňky bakteriálního kmene.

- *Lactobacillus paracasei* RL-10 75B (Sbírka čistých mlékařských kultur Laktoflóra, Tábor, ČR)

#### 4.1.2 DNA pro testování mikročastic s $-NH_2$ skupinou

Byla použita DNA z kuřecích erytrocytů v dehydratované formě. Před použitím byla DNA rozpuštěna v testovaném pufru o daném pH.

#### 4.1.3 Charakteristika použitých magnetických nosičů

Pro izolaci bakteriální DNA byly použity magnetické polymerní mikročástice P(HEMA-*co*-GMA) a P(HEMA-*co*-EDMA) připravené na Ústavu makromolekulární chemie Akademie věd ČR v Praze Ing. D. Horákem, CSc., Jejich povrch byl funkcionalizován hydroxylovými ( $-COOH$ ) nebo aminovými ( $-NH_2$ ) skupinami. Charakteristika nosičů je uvedena v Tabulce 3.

Tabulka 3: Charakteristika nosičů vybraných pro testování

Nosič označení	Polymer	Fe [%hm]	Funkční skupina	Množství skupin [mM/g]	Průměr nosičů [μm]
Fkol 135ox	P(HEMA- <i>co</i> -GMA)	6,6	-COOH	2,61	1,0
FH 46ox	P(HEMA- <i>co</i> -EDMA)	6,55	-COOH	0,85	1,5
NH <sub>2</sub>	P(HEMA- <i>co</i> -GMA)	-	-NH <sub>2</sub>	-	-

Nosiče byly dodány ve vysušené stavu. Před použitím byly nosiče naváženy na koncentraci 2 mg/ml, nebo vyšší (podle potřeby) a byla vytvořena suspenze nosiče ve sterilní vodě. V případě nutnosti přípravy suspenze v testovaném pufru, lze nosiče odseparovat a promýt požadovaným puftrem.

#### 4.1.4 Chemikálie

- Agar (Erba Lachema, Brno, Česká republika)
- Agaróza pro elektroforézu (Serva Electrophoresis, Německo)
- Destilovaná voda (FCH VUT Brno, Brno, ČR)
- DNA velikostní standard (žebříček 100 bp) (MALAMITÉ, Moravské Prusy, Česká republika). Obsahuje fragmenty 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1 000, 1 200 a 1 500 bp.
- Dodecylsulfát sodný, SDS (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- Ethanol p.a. (Penta, Chrudim, Česká republika)
- Ethidium bromid, EtBr (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- Fenol (Erba Lachema, Brno, Česká republika)
- Hydroxid sodný (Erba Lachema, Brno, Česká republika)
- Chlorid sodný (Erba Lachema, Brno, Česká republika)

- Chloroform (Penta, Chrudim, Česká republika)
- Isoamylalkohol (3-methyl-1-butanol) (Erba Lachema, Brno, Česká republika)
- Kyselina ethylendiamintetraoctová, EDTA (Serva Electrophoresis, Německo)
- Lysozym (Serva Electrophoresis, Německo)
- Octan sodný (Erba Lachema, Brno, Česká republika)
- Polyethylenglykol 6 000 (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- Proteináza K (Serva, Heidelberg, Německo)
- RNáza A (Serva, Heidelberg, Německo)
- Tris(hydroxymethyl)aminomethan, Tris-báze (Serva Electrophoresis, Německo)
- Další běžné chemikálie v kvalitě p.a.

#### 4.1.5 Kultivační média

- MRS médium

Složení média bylo převzato z internetových stránek České sbírky mikroorganismů (CCM Brno), jako médium vhodné pro rod *Lactobacillus*. Složení média je uvedeno v následující Tabulce 4. Médium bylo sterilizováno v autoklávu v alikvotních objemech při 121°C po dobu 20 minut a uchovávalo v chladicím boxu při 4°C.

Tabulka 4: Složení média pro rod *Lactobacillus* (CCM Brno)

Složka	Podíl
Kvasničný extrakt	5 g
Masový extrakt	10 g
Pepton	10 g
Glukóza	20 g
Tween 80	5 ml
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2 g
Octan sodný	5 g
Citran amonný	2 g
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0,2 g
MnSO <sub>4</sub> · 4H <sub>2</sub> O	0,05 g
Destilovaná voda	1000 ml

#### 4.1.6 Roztoky pro lyzi bakteriálních buněk

K lyzi bakteriálních buněk byly použity následující roztoky dle Španové a Ritticha [35].

- 10 mM Tris-HCl (pH 7,8)

Roztok byl připraven ředěním ze 1M Tris-HCl zásobního roztoku. Zásobní roztok byl připraven tak, že bylo rozpuštěno 121,1 g Tris-báze v 800 ml destilované vody. Výsledné pH bylo upraveno koncentrovanou HCl na hodnotu 7,8 a roztok byl doplněn destilovanou vodou na objem 1000 ml.

Tento objem byl rozdělen na alikvotní podíly a poté sterilizován 20 minut při 121°C.

- 0,5 M EDTA (pH 8,0)

Zásobní roztok byl připraven tak, že bylo rozpuštěno 186,1 g v 800 ml destilované vody. Výsledné pH bylo upraveno přidáním asi 20 g NaOH. Nejdříve bylo přidáno 15 g NaOH

a poté byl postupně přidáván zbytek po perličkách za stálé kontroly pH roztoku. EDTA bylo rozpuštěno při hodnotě pH 8,0. Vše probíhalo za stálého míchání na magnetické míchače.

Roztok byl doplněn na objem 1000 ml a po rozdělení na alikvotní díly byl sterilizován při 121°C po dobu 20 minut.

- Lyzační roztok A (10 mM Tris-HCl, pH 7,8; 5 mM EDTA, pH 8,0)

Roztok byl připraven ze zásobních roztoků 1 M Tris-HCl (pH 7,8) a 0,5 M EDTA (pH 8,0) a to tak, že byl sterilně smíchán 1 ml 1 M Tris-HCl a 1 ml 0,5 M EDTA a objem byl doplněn sterilní destilovanou vodou na 100 ml.

- Lyzační roztok B (lyzační roztok A s obsahem lysozymu)

Roztok byl připraven ze zásobních roztoků 1 M Tris-HCl (pH 7,8) a 0,5 M EDTA (pH 8,0) a to tak, že byl sterilně smíchán 1 ml 1 M Tris-HCl a 1 ml 0,5 M EDTA a objem byl doplněn sterilní destilovanou vodou na 100 ml.

Před použitím byl k roztoku přidán lysozym ve výsledné koncentraci 3,0 mg/ml.

- SDS (20%)

Bylo rozpuštěno 20 g SDS v 80 ml sterilní destilované vody a objem byl doplněn na konečných 100 ml. Roztok byl ponechán bez sterilizace.

- Proteináza K (100 µg/ml)

Bylo rozpuštěno 100 µg v 1 ml destilované sterilní vody. Množství bylo rozděleno na alikvotní části po 100 µl. Enzym byl uchováván při -20°C.

RNáza A (100 µg/ml)

Enzym byl připraven v 10 mM Tris, pH 7,5 a 1,5 mM NaCl.

#### **4.1.7 Roztoky pro izolaci bakteriální DNA**

K izolaci bakteriální DNA byly použity tyto roztoky dle Španové a Ritticha [35].

##### **4.1.7.1 Roztoky pro izolaci bakteriální DNA fenolovou extrakcí**

- Fenol (pH 7,8)

Fenol byl predestilován při 159°C v přítomnosti zinkového prášku. Výsledné pH bylo upraveno na hodnotu 7,8. Poté byl přidán oxychinolin (1%), vodní fáze byla odebrána a byl přidán TE pufr. Fenol byl uchováván při -20°C.

- CIZ

Směs chloroform – isoamylalkohol v poměru 24:1

- Roztok octanu sodného (3 M)

Roztok byl připraven rozpuštěním 40,81 g CH<sub>3</sub>COONa . 3 H<sub>2</sub>O v 80 ml destilované vody. Výsledné pH bylo upraveno ledovou kyselinou octovou na 5,2 a roztok byl doplněn na konečný objem 100 ml. Sterilizace byla provedena při 121°C po dobu 20 minut a roztok byl uchováván při 4°C.

- TE pufr (10 mM Tris-HCl, pH 7,8; 1 mM EDTA, pH 8,0)

Bylo sterilně smícháno 1 ml 1 M Tris-HCl (pH 7,8) s 0,2 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0) a roztok byl doplněn sterilní vodou na konečný objem 100 ml.

#### **4.1.7.2 Roztoky pro izolaci bakteriální DNA magnetickým nosičem**

- 5 M NaCl

Bylo rozpuštěno 58,4 g NaCl ve 150 ml destilované vody, objem byl doplněn na konečných 200 ml. Roztok byl sterilizován při 121°C po dobu 15 minut.

- Roztok poly(ethylenglykolu) PEG 6000 (40 %)

Bylo rozpuštěno 40 g PEG 6000 v 60 ml destilované vody. Dále byl objem doplněn na 100 ml. Roztok byl uchováván při 4°C

- Ethanol (70 %)

Roztok byl ředěn ze zásobního roztoku o koncentraci 96 %. Bylo smícháno 70 ml 96 % ethanolu s 26 ml destilované vody. Roztok byl uchováván při laboratorní teplotě.

- 10 mM Tris o pH 7,0; 7,6; 8,0; 8,5

Roztok byl připraven ředěním ze 1M Tris zásobního roztoku. Zásobní roztok byl připraven tak, že bylo rozpuštěno 121,1 g Tris-báze v 800 ml destilované vody. Výsledné pH bylo upraveno koncentrovanou HCl na požadovanou hodnotu pH a roztok byl doplněn destilovanou vodou na objem 1000 ml.

Tento objem byl rozdělen na alikvotní podíly a poté sterilizován 20 minut při teplotě 121°C.

#### **4.1.8 Roztoky pro agarózovou gelovou elektroforézu DNA**

- TBE pufr (5x koncentrovaný)

Roztok byl připraven rozpuštěním 54 g Tris-báze a 27,5 g kyseliny borité v 600 ml destilované vody. Dále bylo přidáno 20 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0), výsledné pH bylo upraveno pomocí 1 M NaOH na konečnou hodnotu 8,0. Roztok byl doplněn na objem 1 l. V případě přítomnosti pevných částic byl roztok přefiltrován. Před použitím byl roztok naředěn 10x destilovanou vodou.

- Agarózový gel

Pro přípravu agarózového gelu bylo rozvařeno 1,8 g agarózy ve 100 ml 0,5x koncentrovaného TBE pufru.

- Ethidium bromid (Erbe) (0,5 µg/ml)

Pro přípravu roztoku byl zásobní roztok EtBr (2,5 mg/ml) naředěn a to tak, že bylo 100 µl zásobního roztoku přidáno do 500 ml sterilní destilované vody.

- Nanášecí pufr

6x koncentrovaný pufr: 750 mM Tris-HCl, pH 8,8; 200 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 1% Tween 20; 25 mM MgCl<sub>2</sub>.

#### 4.1.9 Přístroje a pomůcky

- Analytické váhy pioneer<sup>TM</sup> PA 114 (Ohaus, New Jersey, USA)
- Centrifuga Mini spin (Eppendorf, Hamburg, SRN)
- Exikátor (KIF LAB, Freiburg, SRN)
- Laboratorní váhy CS 200 (Ohaus, New Jersey, USA)
- Magnetický separátor DynaMag<sup>TM</sup> (Invitrogen, Oslo, Norsko)
- Mikrovlnná trouba SMW 2320 (Sencor, ČR)
- MiniCykler<sup>TM</sup> PTC 150 (JM Research, Watertown, USA)
- NanoPhotometr<sup>TM</sup> (Implen, Mnichov, SRN)
- Termostat – Mini Incubator 230 V (Pagnet, New Jersey, USA)
- Transiluminátor Spectroline<sup>®</sup> TVR-312A/F (Spectronics Corporation, Westbury, USA)
- Zařízení pro elektroforézu Easy-Část, model B1 (OwlScientific, USA)
- Zdroj elektrického napětí pro elektroforézu Enduro<sup>TM</sup> 300 V (Pagnet, New Jersey, USA)
- Další běžné laboratorní vybavení

#### 4.2 Metody

V této kapitole jsou vysvětleny postupy a metody použité při práci v laboratoři v rámci této diplomové práce. Návod byl převzatý ze skript Analýza vybraných druhů bakterií mléčného kvašení pomocí metod molekulární biologie [35].

##### 4.2.1 Kultivace bakteriálních buněk

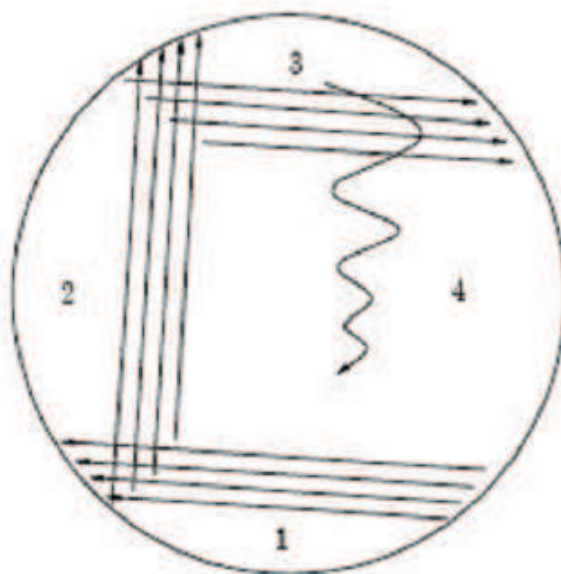
Očkování bylo provedeno v očkovacím boxu. Do zkumavek bylo pipetováno 10 ml živného MRS média. Do zkumavek s médiem byla naočkována kultura *Lactobacillus sp.* RL – 10 v množství 100 µl.

Kultivace probíhala v inkubátoru při 37°C po dobu 24 hodin. Poté byla kultura použita k přípravě hrubých lyzátů buněk a dále pak k izolaci DNA fenolovou extrakcí a k izolaci DNA magnetickým nosičem.

##### 4.2.2 Kontrola čistoty bakteriální kultury

Kontrola čistoty bakteriální kultury byla provedena metodou křížového roztěru. Bakteriální kultura narostlá v tekutém živném médiu byla naočkována na Petriho misku s pevným živným médiem. Způsob provedení křížového roztěru je uveden na Obrázku 8.

*Obrázek 8: Provedení křížového roztěru při kontrole čistoty bakteriální kultury*



Upraveno dle [1]

Kultivace byla provedena v termostatu při 37°C po dobu 24 hodin. Po kultivaci byly kolonie narostlé na agaru vyhodnoceny. Hlavními body hodnocení byly vzhled kolonie, její barva, velikost, tvar a další.

#### **4.2.3 Lyze bakteriálních buněk**

Hrubý lyzát buněk, který se dále využívá při izolaci bakteriální DNA, byl připraven z přes noc narostlé kultury.

Postup lyze bakteriálních buněk je popsán v následujících několika bodech.

- 1) Z bakteriální kultury byl odpipetován 1 ml (případně 3ml – upřesnění ve výsledcích) do Eppendorfovy mikrozkušavky (objem 1,5 ml) a poté byl obsah centrifugován při 14 500 ot/min po dobu 5 minut. Po dokončení centrifugace byl supernatant slit a okapán.
- 2) Sedimentované buňky byly resuspendovány v 1 ml lyzačního roztoku A. Nejdříve bylo přidáno 100 µl pro snadnější manipulaci při resuspendování a poté byl přidán zbytek (900 µl). Suspenze byla opět centrifugována při 14 500 ot/min po dobu 5 minut.
- 3) K sedimentu bylo přidáno 500 µl lyzačního roztoku B a buňky byly dokonale resuspendovány.
- 4) Vzorky byly inkubovány při laboratorní teplotě po dobu 1 hodiny.
- 5) Po inkubaci bylo ke vzorkům přidáno 12,5 µl 20 % SDS a 5 µl proteinázy K (100 µg/ml), vše bylo dobře promícháno.
- 6) Dále byly vzorky inkubovány při 55°C cca 3 hodiny, popřípadě přes noc. Vzorky byly občas promíchány.



- 7) Po inkubaci bylo k části vzorkům přidáno 10 µl RNázy A (100 µg/ml), vzorky byly promíchány a inkubovány při 37°C po dobu 30 minut.

Takto připravené hrubé lyzáty buněk byly ihned použity pro další izolaci DNA, nebo byly uchovávány při teplotě -20°C.

#### **4.2.4 Izolace bakteriální DNA fenolovou extrakcí**

Z připravených hrubých lyzátů buněk (s RNázou A i bez RNázy A) byla izolována bakteriální DNA. Jedna z použitých metod byla fenolová extrakce. Postup při této metodě je popsán v následujících několika bodech.

- 1) Z připraveného hrubého lyzátu bylo odebráno 500 µl, nebo 100 µl a přeneseno do čisté sterilní Eppendorfovy zkumavky. Poté byl k množství lyzátu přidán stejný objem fenolu (předestilovaný, pH 7,8).
- 2) Směs byla opatrně promíchávána kývavým pohybem po dobu 4 minut. Následně byla směs centrifugována při 14 500 ot/min po dobu 5 minut.
- 3) Vodní fáze byla opatrně odpipetována pomocí špičky se zastřiženým koncem do čisté sterilní Eppendorfovy zkumavky a objem byl doplněn TE pufrem na hodnotu 500 µl.
- 4) K vodní fázi doplněné na požadovaný objem bylo přidáno 700 µl směsi chloroform – isoamylalkohol (24:1). Směs byla opět opatrně promíchávána kývavým pohybem po dobu 4 minut a poté centrifugována při 14 500 ot/min po dobu 10 minut.
- 5) Vodní fáze byla odpipetována do čisté sterilní Eppendorfovy zkumavky.

#### **4.2.5 Srážení DNA ethanolem**

Při izolaci fenolovou extrakcí je často vzorek DNA znečištěn použitými chemikáliemi, proto se přistupuje k procesu přečištění DNA srážením ethanolem. Tento postup byl použit také při změně pufru, ve kterém byla izolovaná DNA rozpouštěna. Postup procesu je popsán níže.

- 1) Vodní fáze s DNA z předchozího kroku byla doplněna automatickou pipetou na objem 400 µl TE pufrem. Dále byl ke vzorku přimíchán 3 M octan sodný v objemovém množství 1/20 celkového objemu (20 µl) a směs byla dobře promíchána.
- 2) Poté byl ke vzorku přimíchán 96 % ethanol vychlazený na -20°C a to v objemovém množství 2,5 násobku objemu původního vzorku (1 ml). Směs byla dobře promíchána a ponechána k vysrážení DNA 15 – 20 minut při teplotě -20°C.
- 3) Po vysrážení byla směs centrifugována při 14 500 ot/min po dobu 15 minut. Následně byl supernatant opatrně slit.
- 4) Sediment byl propláchnut 500 µl ethanolu o koncentraci 70 % a opět byla směs centrifugována při 14 500 ot/min po dobu 10 minut. Supernatant byl opatrně slit a sediment byl sušen v exsikátoru po dobu 15 minut.
- 5) Sedimentovaná přečištěná DNA byla v závěru rozpuštěna v 500 µl (popřípadě do 50 µl) TE pufru.

Takto přečištěná bakteriální DNA byla pro krátkodobou úchovu ponechána při 4°C, nebo pro dlouhodobou úchovu zamrazena na -20°C. Tato DNA byla použita pro agarózovou gelovou elektroforézu a jako matrice pro metodu PCR.



#### 4.2.6 Izolace DNA magnetickým nosičem

Izolace magnetickým nosičem je alternativní metoda pro získávání DNA z hrubého lyzátu buněk. Směs komponentů a jejich pořadí je uvedeno v Tabulce 5, postup je popsán níže v bodech.

Izolace proběhla z hrubých lyzátů jak s použitím enzymu RNáza A, tak i bez degradace RNA pomocí RNázy A.

*Tabulka 5: Složení směsi pro izolaci DNA pomocí magnetických nosičů*

Krok	Komponenta	Objem (μl)
1	Voda	0
2	NaCl (5 M)	400
3	Hrubý lyzát buněk	100
4	PEG 6000 (40 %)	400
5	Magnetický nosič (2 mg/ml)	100
Celkem		1000

- 1) Složky směsi pro izolaci DNA byly smíchány v pořadí a množství, ve kterém jsou uvedeny v předchozí tabulce (Tabulka 5). Výsledná koncentrace složek PEG 6000 a NaCl byly: PEG 6000 – 16 %, NaCl – 2 M
- 2) Po smíchání složek byla suspenze inkubována při laboratorní teplotě po dobu 15 minut. Po uplynutí doby inkubace byly zkumavky umístěny na 15 minut do magnetického separátoru a nosič byl odseparován. V přítomnosti magnetického pásu (magnetu) byl supernatant opatrně odpipetován ze zkumavky.
- 3) Magnetický nosič s navázanou DNA bez přítomnosti magnetického pásu (magnetu) byl promyt 500 μl 70 % ethanolu. Směs nosiče a ethanolu byla promíchána a nosič byl opět odseparován za použití magnetického separátoru. Separace probíhala po dobu 2 minut.
- 4) Supernatant byl opatrně odpipetován ze zkumavky v přítomnosti magnetického pruhu. Ethanol v nosiči byl odpařen v mini-inkubátoru při teplotě 55°C.
- 5) DNA navázaná na nosič byla eluována do 50 μl TE pufru po dobu 30 minut. Poté byl nosič odseparován magnetem a TE pufr s DNA byl odpipetován do čisté sterilní Eppendorfovy zkumavky.

Takto izolovaná bakteriální DNA byla pro krátkodobou úchovu ponechána při 4 °C, nebo pro dlouhodobou úchovu zamrazena na -20 °C. Při práci byla DNA použita pro agarózovou gelovou elektroforézu jako matrice pro metodu PCR.

#### 4.2.7 Podmínky izolace DNA pomocí elektrostatických sil

DNA kuřecích erytrocytů byla rozpuštěna v 10 mM Tris pufru o různém pH (7,0; 7,6; 8,0; 8,5) a byla použita k testování podmínek vazby na mikročástice s funkční skupinou –NH<sub>2</sub>. Koncentrace DNA se pohybovala v hodnotách 500 ng/μl a více. Postup izolace je uveden níže.

- 1) K 50 μl DNA z kuřecích erytrocytů rozpuštěné v 10 mM Tris pufru o daném pH bylo napipetováno 50 μl magnetických mikročástic suspendovaných v 10 mM Tris pufru o stejném pH. Koncentrace mikročástic byla 10 mg/ml.

- 2) Směs byla promíchána a inkubována při laboratorní teplotě po dobu 3 hodin.
- 3) Magnetický nosič byl odseparován pomocí magnetického separátoru a supernatant byl odpipetován do čisté mikrokumavky. V supernatantu byla změřena koncentrace DNA.
- 4) Magnetický nosič byl promyt 400  $\mu$ l 70 % ethanolu a opatrně vysušen v exsikátoru.
- 5) Po usušení byla DNA eluována z nosiče do 50  $\mu$ l TE pufru o pH 9,0. Eluce probíhala 30 minut při laboratorní teplotě a pak při 4 °C do druhého dne.
- 6) K vyhodnocení byla použita koncentrace DNA před vazbou na nosič (výchozí koncentrace DNA), hodnota koncentrace DNA v supernatantu a hodnota koncentrace eluované DNA.

#### 4.2.8 Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty DNA

Měření koncentrace a čistoty izolované DNA bylo provedeno na přístroji NanoPhotometer za použití speciální kyvety (LabelGuard). Vzorky byly temperovány na laboratorní teplotu a před měřením řádně zamíchány. Jako slepý vzorek (referenční vzorek) byl použit TE pufr, ve kterém byla DNA po izolaci rozpuštěna. V případě supernatantu byl slepý vzorek pufr, ve kterém byla DNA rozpuštěna.

Na přístroji byla měřena absorbance při vlnových délkách 230, 260, 280 a 320 nm. Dále byly odečteny poměry absorbancí při vlnových délkách  $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$  a  $A_{260\text{nm}}/A_{320\text{nm}}$ . Koncentrace (ng/ $\mu$ l) byla odečtena z displeje přístroje. Určující pro ni je hodnota absorbance při 260 nm.

##### 4.2.8.1 Postup měření na NanoPhotometru

- Byl zapnut přístroj
- Byla vložena kyveta LabelGuard
- Byl vybrán soubor 1. Labelguard Applications
- Požadavky na měření byly vybrány  $\rightarrow$  1. Nucleic acids  $\rightarrow$  1. ds DNA
- Parametry byly zkontrolovány (Lid factor podle výběru víčka) a potvrzeny.
- Byl změřen slepý vzorek
- Vzorek byl proměřen (objem podle zvoleného víčka – viz Tabulka 6)
- Po měření byl vzorek odpipetován
- Kyveta byla otřena ethanolom a osušena hadříkem
- Přístroj byl vypnut

*Tabulka 6: Parametry k měření podle zvoleného víčka*

Víčko	Lid 5	Lid 10	Lid 50
Optická dráha (nm)	2	1	0,2
Objem vzorku ( $\mu$ l)	6 – 10	3 – 5	0,7 – 4
Rozsah koncentrace DNA (ng/ $\mu$ l)	7 – 350	14 – 700	250 – 4000

Pro potřeby experimentu bylo zvoleno víčko Lid 10 s optickou dráhou 1 nm. Na kyvetu byl nanášen vzorek pro měření v objemu 3  $\mu$ l. Před měřením byl nastaven jako slepý vzorek TE pufr. Vzorek pro slepý vzorek byl na kyvetu nanášen ve stejném objemu jako měřený vzorek (3  $\mu$ l).

Víčko i kyveta byly otřeny po každém měření ethanolom a suchým hadříkem. Koncentrace DNA, hodnoty absorbance  $A_{260\text{nm}}$ ,  $A_{280\text{nm}}$ ,  $A_{230\text{nm}}$ ,  $A_{320\text{nm}}$  a další informace byly odečteny z displeje přístroje.

Celková hmotnost izolované DNA byla vypočtena převedením koncentrace na objem TE pufru, do kterého byla DNA eluována dle Rovnice 1.

*Rovnice 1: Výpočet celkové hmotnosti izolované DNA*

$$m = c \cdot V$$

Kvalita DNA byla hodnocena podle hodnot odečtených z displeje přístroje.

Zhodnocení výstupu z přístroje:

$A_{230\text{nm}}$  – absorbuje fenol

$A_{260\text{nm}}$  – absorbuje nukleová kyselina

$A_{280\text{nm}}$  – absorbují proteiny

$A_{320\text{nm}}$  – pozadí

$A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$  – čistota DNA (1,8 – 2,0)

- $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}} > 2$  – kontaminace RNA
- $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}} < 1,8$  – kontaminace proteiny

#### 4.2.9 Ověření kvality izolované DNA metodou PCR

Pro ověření kvality izolované bakteriální DNA byla použita metoda PCR. Kontrola proběhla s DNA izolovanou metodou fenolové extrakce i s DNA izolovanou pomocí magnetického nosiče.

V následující Tabulce 7 je přehled komponent PCR směsi a jejich objemové zastoupení. Jedna sada primerů byla použita na PCR pro rod *Lactobacillus* a druhá sada primerů byla použita na PCR pro doménu *Bacteria*.

*Tabulka 7: Komponenty pro přípravu směsi pro PCR*

Komponenty	Objem [μl]
Voda pro PCR	19,0
Reakční pufr kompletní (10x koncentrovaný)	2,5
Směs dNTP (10mM)	0,5
Primer 1 (10 pmol/μl)	0,5
Primer 2 (10 pmol/μl)	0,5
<i>Taq</i> DNA-polymeráza (1U/μl)	1,0
Matrice DNA	1,0
<b>Celkem</b>	<b>25,0</b>

##### 4.2.9.1 Postup pro přípravu směsí pro PCR.

- 1) Všechny komponenty byly před použitím promíchány a centrifugovány. Směs byla připravována ve sterilním boxu a v rukavicích. Po každém pipetování byla směs řádně zamíchána. Před spuštěním cyklu byly vzorky stočeny na centrifuze, aby nezůstaly kapky na stěnách zkumavek.
- 2) Komponenty byly míchány v pořadí a v objemovém množství uvedeném v Tabulce 7, dále při negativní kontrole byla místo DNA matrice použita PCR voda a v případě pozitivní kontroly DNA rodu *Lactobacillus* o koncentraci 10 ng/μl
- 3) Na cyklu byl nastaven program pro požadovanou PCR. Jeho kroky jsou uvedeny v Tabulce 8 (rod *Lactobacillus*) a v Tabulce 10 (doména *Bacteria*).

- 4) Kroky 2 – 4 jsou opakovány v 29-ti cyklech. Celkový počet cyklů byl 30. Po skončení amplifikace dochází k chlazení cykleru až na teplotu 10 °C, při které v případě potřeby lze DNA nějakou dobu uchovat.
- 5) Získané produkty PCR (amplikony) byly detegovány agarózovou gelovou elektroforézou. Jejich velikost je pro rod *Lactobacillus* 250 bp a pro doménu *Bacteria* 466 bp.

#### 4.2.9.2 PCR pro rod *Lactobacillus*

Pro metodu PCR byly použity specifické primery pro rod *Lactobacillus*. Tyto primery umožnily potvrzení přítomnosti specifické DNA ve vzorku. Použité primery a jejich sekvence jsou uvedeny v Tabulce 8.

Tabulka 8: Primery specifické pro rod *Lactobacillus*.

Primer	Sekvence primeru (5'-3')	Velikost PCR produktu	Zdroj [36]
LbLMA 1-rev	CTC AAA ACT AAA CAA AGT TTC	250 bp	Dubernet a spol. 2002
R16-1	CTT GTA CAC ACC GCC CGT CA		

Termocykler umožňuje vlastní nastavení programů. Pro rod *Lactobacillus* byl zvolen program s názvem LBCROD. Jeho kroky jsou popsány v Tabulce 9. Po skončení amplifikace byly vzorky nanášeny na gel.

Tabulka 9: Kroky programu rodu *Lactobacillus* při metodě PCR

LBCROD		
Krok	Teplota [°C]	Čas
1	95	5 min
2	95	30 s
3	55	30 s
4	72	60 s
5	72	10 min

#### 4.2.9.3 PCR pro doménu *Bacteria*

Pro metodu PCR byly použity specifické primery pro doménu *Bacteria*. Tyto primery umožnily potvrzení přítomnosti specifické DNA ve vzorku. Použité primery a jejich sekvence jsou uvedeny v Tabulce 10.

Tabulka 10: Primery specifické pro doménu *Bacteria*.

Primer	Sekvence primeru (5'-3')	Velikost PCR produktu	Zdroj [37]
F eub	TCC TAC GGG AGG CAG CAG T	466 bp	Haarman a Knol 2006
R eub	GGA CTA CCA GGG TAT CTA ATC CTG TT		

Termocykler umožňuje vlastní nastavení programů. Pro doménu *Bacteria* byl zvolen program určený pro tuto amplifikaci. Jeho kroky jsou popsány v Tabulce 11. Po skončení amplifikace byly vzorky nanášeny na gel.

Tabulka 11: Kroky programu pro doménu *Bacteria* při metodě PCR

BACTERIA		
Krok	Teplota [°C]	Čas
1	94	5 min
2	94	30 s
3	56	30 s
4	72	60 s
5	72	10 min

#### 4.2.10 Agarózová gelová elektroforéza DNA

Agarózová gelová elektroforéza je metoda pomocí které lze detegovat izolovanou DNA, včetně produktů PCR (amplifikované fragmenty DNA – amplikony)

Postup analýzy a postup přípravy gelu je popsán níže.

- 1) Byl připraven agarózový gel. Pro detekci bakteriální DNA byl použit gel o koncentraci 0,8 % (bylo naváženo 0,4 g agarózy do 50 ml 0,5x TBE pufru). Pro detekci produktů PCR byl použit gel o koncentraci 1,5 % (bylo naváženo 0,75 g agarózy do 50 ml 0,5x TBE pufru).
- 2) Suspenze agarózy 0,5x TBE pufru byla pečlivě rozvařena v mikrovlnné troubě. Gel byl ponechán 5x přejít varem. Rozvařený gel byl nalit do předem připravené elektroforetické vaničky s hřebínkem (velikost podle množství vzorků). Po zatuhnutí gelu (cca 1 hodina) byl odstraněn hřebínek, tak aby nedošlo k poškození vytvořených komůrek.
- 3) Vzorky byly nanášeny spolu s nanášecím pufrem. Na parafilm bylo naneseno 15  $\mu$ l vzorku DNA a 3  $\mu$ l nanášecího pufru, nebo 25  $\mu$ l vzorku DNA a 5  $\mu$ l nanášecího pufru. Směs byla zamíchána a nanesena do komůrek.
- 4) Jako standard u PCR produktů byl použit žebříček 100 bp.
- 5) Gel byl přenesen do elektroforetické nádoby a zalit 0,5x TBE pufrem do výšky asi 3 mm nad gel. Elektroforéza probíhala 2 hodiny při napětí 80 V.
- 6) Po ukončení migrace v gelu byla DNA nabarvena v ethidiumbromidové lázni a vizualizována na transiluminátoru v UV světla o vlnové délce  $\lambda = 305$  nm
- 7) Výsledek byl dokumentován za použití digitálního fotoaparátu

#### 4.2.11 Stanovení citlivosti metody PCR

Pro zjištění nejmenšího množství DNA, které se amplifikuje metodou PCR za vzniku detegovatelného produktu PCR, bylo provedeno stanovení citlivosti. Postup byl následující:

- 1) Kvalitní DNA ověřená v PCR v předchozích experimentech byla naředěna na koncentrace 10 ng/ $\mu$ l, 1 ng/ $\mu$ l, 100 pg/ $\mu$ l, 10 pg/ $\mu$ l, 1 pg/ $\mu$ l, 100 fg/ $\mu$ l, 10 fg/ $\mu$ l.
- 2) Takto naředěná DNA byla použita v objemu 1  $\mu$ l pro PCR se specifickými primery pro rod *Lactobacillus* (citlivost PCR pro rod *Lactobacillus*) a pro PCR se specifickými primery pro doménu *Bacteria* (citlivost PCR pro doménu *Bacteria*).
- 3) Produkty PCR byly detegovány agarózovou gelovou elektroforézou.

## 5 VÝSLEDKY

### 5.1 Příprava hrubých lyzátů buněk s a bez působení RNázy A

Hrubé lyzáty buněk byly připraveny dle postupu uvedeného v kapitole 4.2.3. V experimentu byl sledován vliv degradace RNA v hrubém lyzátu buněk na izolaci DNA. Přítomnost DNA v hrubých lyzátech buněk byla ověřena vynesemím vzorků na gel. Výsledky jsou uvedeny na Obrázku 11 (běh č. 1 a 2).

→ Na gelu jsou patrné pásy potvrzující přítomnost DNA v hrubých lyzátech buněk. Lze předpokládat úspěšné provedení lyze bakteriálních buněk.

### 5.2 Izolace bakteriální DNA fenolovou extrakcí z různého množství hrubých lyzátů buněk

DNA byla izolována z hrubých lyzátů buněk s RNA degradovanou pomocí RNázy A (100 µg/ml) a z hrubých lyzátů bez přídavku RNázy A. Pro izolaci byly použity hrubé lyzáty buněk o objemu 100 a 500 µl.

V experimentu byl sledován vliv degradace RNA množství izolované DNA.

#### 5.2.1 Izolace DNA z 500 µl hrubého lyzátu

Pro izolaci DNA bylo použito 500 µl hrubého lyzátu buněk připraveného z 1 ml bakteriální kultury. Izolovaná DNA byla rozpuštěna v 500 µl TE pufru. Vše bylo provedeno dle návodu uvedeného v kapitole č. 4.2.4 V Tabulce 12 jsou uvedeny hodnoty DNA, izolované metodou fenolové extrakce, naměřené pomocí NanoPhotometru a jejich vyhodnocení. Celkové množství DNA bylo počítáno podle Rovnice 1.

Tabulka 12: Hodnoty koncentrace DNA izolované fenolovou extrakcí

Hrubý lyzát buněk			Izolovaná DNA			Absorbance (nm)				
Objem kultury [ml]	RNáza A [100µg/ml]	Objem lyzátu k izolaci [µl]	$c_{\text{spektr.}}$ [ng/µl]	TE pufr [µl]	$m_{\text{celková}}$ [ng]	230	260	280	320	260 / 280
1	+	500	53	500	2 650	0,02	0,09	0,03	-	2,59
1	-	500	55	500	2 750	0,04	0,10	0,04	-	2,23

Bylo použito 500 µl hrubého lyzátu buněk.

+ v hrubém lyzátu buněk byla enzymaticky degradována RNA

- v hrubém lyzátu buněk nebyla enzymaticky degradována RNA

Z 500 µl hrubého lyzátu buněk byla izolována DNA o koncentraci 53 ng/µl a 55 ng/µl. DNA byla rozpuštěna v 500 µl TE pufru.

→ Není rozdíl v množství izolované DNA při použití hrubého lyzátu buněk s enzymaticky degradovanou RNA a nedegradovanou RNA. Celková hmotnost DNA byla 2 650 ng a 2 750 ng.



### 5.2.2 Izolace DNA z 100 µl hrubého lyzátu buněk

Hrubé lyzáty byly připraveny z 1 a 3 ml bakteriální kultury narostlé přes noc. Pro izolaci bylo použito 100 µl hrubého lyzátu buněk. Izolovaná DNA byla rozpuštěna v 50 µl TE pufru, z důvodu lepší možnosti srovnání s izolací DNA magnetickým nosičem. Naměřené hodnoty koncentrací DNA a absorbance získané ze spektrofotometru jsou uvedeny v Tabulce 13. Celkové množství DNA bylo počítáno podle Rovnice 1.

*Tabulka 13: Hodnoty koncentrace DNA izolované fenolovou extrakcí*

Hrubý lyzát buněk			Izolovaná DNA			Absorbance [nm]				
Množství kultury [ml]	RNáza A [100µg/ml]	Množství lyzátu k izolaci [µl]	c <sub>spektr.</sub> [ng/µl]	TE pufr [µl]	m <sub>celková</sub> [ng]	230	260	280	320	260/280
3	+	100	136	50	6 800	0,23	0,28	0,13	0,01	2,59
3	-	100	173	50	8 650	0,58*	0,38	0,17	0,03	2,42
1	+	100	44,5	50	2 225	0,06	0,08	0,04	0,01	2,07
1	-	100	62	50	3 100	0,01	0,12	0,06	0,01	2,10

Bylo použito 100 µl hrubého lyzátu buněk.

+ v hrubém lyzátu buněk byla enzymaticky degradována RNA

- v hrubém lyzátu buněk nebyla enzymaticky degradována RNA

\* pravděpodobně znečištěno fenolem

Z hrubých lyzátů buněk (100 µl) připravených z 3 ml bakteriální kultury byla izolována DNA o koncentraci 136 ng/µl a 173 ng/µl. Z hrubých lyzátů buněk (100 µl) připravených z 1 ml bakteriální kultury byla izolována DNA o koncentraci 44,5 ng/µl a 62 ng/µl.

→ Není výrazný rozdíl v množství izolované DNA při použití hrubého lyzátu buněk s enzymaticky degradovanou RNA a nedegradovanou RNA. Naopak záleží na množství bakteriální kultury použité při přípravě hrubého lyzátu buněk.

### 5.3 Izolace DNA magnetickými nosiči Fkol 135ox a FH 46ox

DNA byla izolována z hrubých lyzátů buněk s RNA enzymaticky degradovanou pomocí enzymu RNáza A (100µg/ml) a s nedegradovanou RNA. Izolace byla provedena dle návodu uvedeného v kapitole 4.2.6.

#### 5.3.1 Izolace DNA magnetickým nosičem Fkol 135ox

Pro izolaci bylo použito 100 µl hrubého lyzátu buněk připraveného z různých množství bakteriální kultury. Izolovaná DNA byla eluována do 50 µl TE pufru. K izolaci byl použit magnetický nosič Fkol 135ox. Naměřené hodnoty koncentrací DNA a absorbance získané ze spektrofotometru jsou uvedeny v Tabulce 14. Celková hmotnost izolované DNA byla vypočtena převedením koncentrace na objem TE pufru, do kterého byla DNA eluována. Vše bylo počítáno podle Rovnice 1 v kapitole 4.2.8.

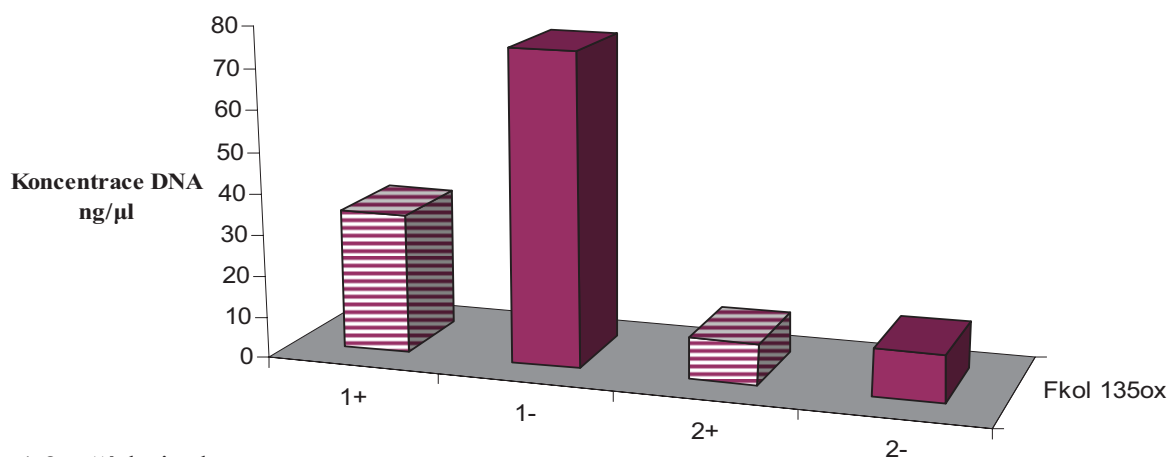
Tabulka 14: Hodnoty absorbance DNA izolované magnetickým nosičem Fkol 135ox.

Nosič	Hrubý lyzát buněk			Izolovaná DNA			Absorbance [nm]				
	Objem kultury [ml]	RNáza A [100µg/ml]	Objem lyzátu k izolaci [µl]	c <sub>spektr.</sub> [ng/µl]	TE pufr [µl]	m <sub>celková</sub> [ng]	230	260	280	320	260/280
Fkol 135ox	3	+	100	34	50	1 700	0,04	0,10	0,80	0,03	1,39
	3	-	100	75,5	50	3 775	0,19	0,25	0,20	0,09	1,47
	1	+	100	10	50	500	0,01	0,06	0,05	0,02	1,33
	1	-	100	11,5	50	575	0,02	0,06	0,04	0,02	1,77

- + v hrubém lyzátu buněk byla enzymaticky degradována RNA
- v hrubém lyzátu buněk nebyla enzymaticky degradována RNA

Byla izolována DNA z hrubých lyzátů buněk (100 µl) připravených z 3 ml bakteriální kultury o koncentraci 34 ng/µl a 75,5 ng/µl. Byla izolovaná DNA z hrubých lyzátů buněk (100 µl) připravených z 1 ml bakteriální kultury o koncentraci 10 ng/µl a 11,5 ng/µl. Pro názornost byly hodnoty vyneseny do Grafu 1.

Graf 1: Grafické znázornění koncentrací DNA izolované pomocí magnetického nosiče Fkol 135ox z hrubých lyzátů buněk s degradovanou nebo nedegradovanou RNA.



1,2 – číslo izolace

- + V hrubém lyzátu buněk byla enzymaticky degradována RNA
- V hrubém lyzátu buněk nebyla enzymaticky degradována RNA

→ Větší množství DNA bylo izolováno z hrubých lyzátů bez přídavku RNázy A, tedy bez degradace RNA.

### 5.3.2 Izolace DNA magnetickým nosičem FH 46ox

Pro izolaci bylo použito 100 µl hrubého lyzátu buněk. Izolovaná DNA byla eluována do 50 µl TE pufru. Naměřené hodnoty koncentrací DNA a absorbance získané ze spektrofotometru jsou uvedeny v Tabulce 15. Celková hmotnost izolované DNA byla



vypočtena převedením koncentrace na objem TE pufru, do kterého byla DNA eluována. Vše bylo počítáno podle Rovnice 1 v kapitole 4.2.8.

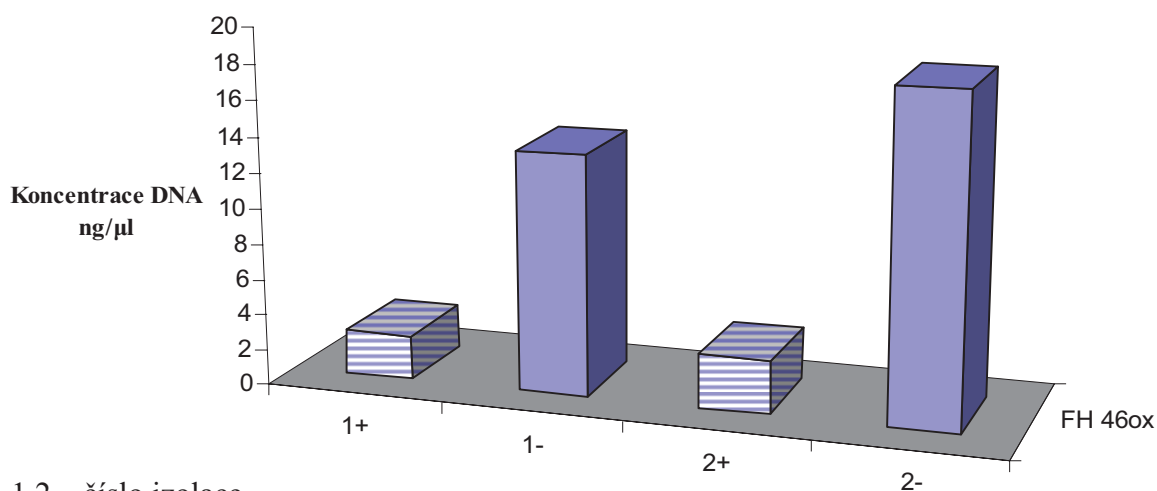
*Tabulka 15: Hodnoty absorbancí DNA izolované magnetickým nosičem FH 46ox.*

Nosič	Hrubý lyzát		Izolovaná DNA			Absorbance [nm]				
	Objem kultury [ml]	RNýza A [100µg/ml]	c <sub>spektr.</sub> [ng/µl]	TE pufr [µl]	m <sub>celková</sub> [ng]	230	260	280	320	260/280
FH 46ox	1	+	2,5	50	125	0,01	0,01	0,01	0,01	1,00
	1	-	13,5	50	675	0,03	0,04	0,04	0,01	1,08
	1	+	3	50	150	0,03	0,01	0,01	0,01	1,20
	1	-	18,3	50	915	0,16	0,10	0,05	0,02	2,28

- + v hrubém lyzátu buněk byla enzymaticky degradována RNA
- v hrubém lyzátu buněk nebyla enzymaticky degradována RNA

Byla izolována DNA z hrubých lyzátů buněk (100 µl) připravených z 1 ml bakteriální kultury o koncentraci 2,5 ng/µl a 13,5 ng/µl. Byla izolovaná DNA z hrubých lyzátů buněk (100 µl) připravených z 1 ml bakteriální kultury o koncentraci 3 ng/µl a 18,3 ng/µl. Pro názornost byly hodnoty vyneseny do Grafu 2.

*Graf 2: Grafické zobrazení koncentrací DNA izolované pomocí magnetického nosiče FH 46ox z hrubých lyzátů buněk s degradovanou nebo nedegradovanou RNA.*



1,2 – číslo izolace

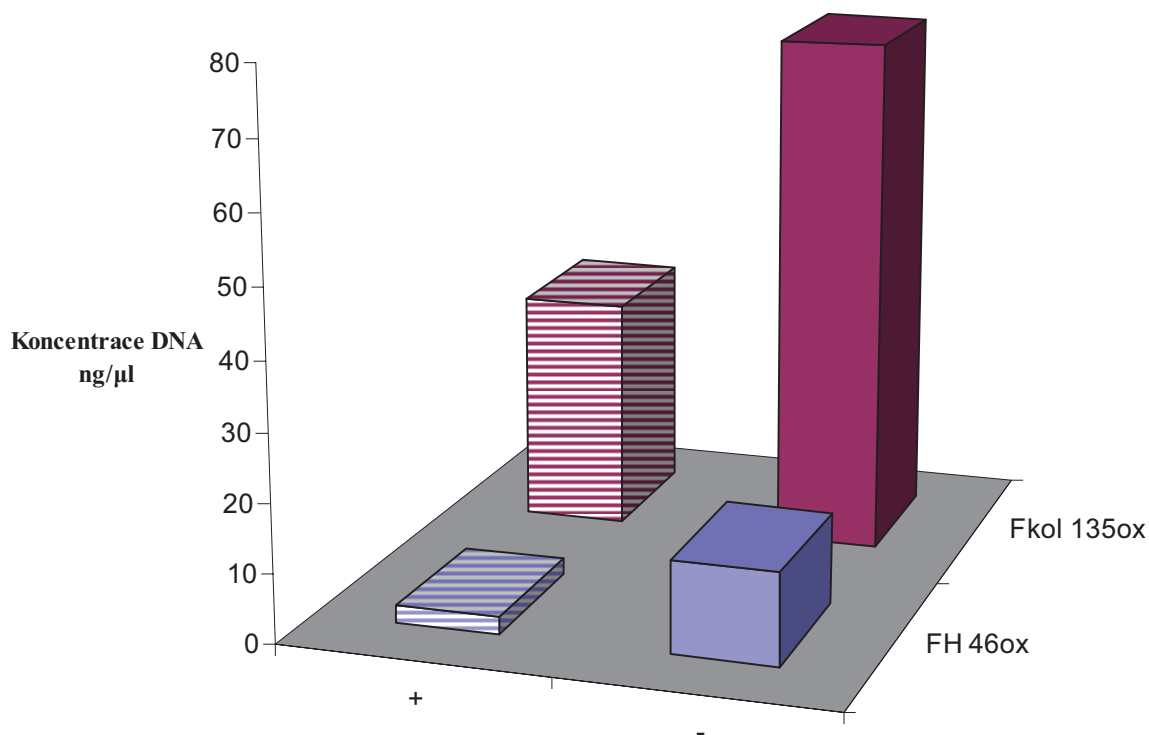
- + V hrubém lyzátu buněk byla enzymaticky degradována RNA
- V hrubém lyzátu buněk nebyla enzymaticky degradována RNA

→ Z grafického znázornění je patrné, že koncentrace DNA při izolaci za použití hrubého lyzátu s nedegradovanou RNA, je vyšší než při izolaci za použití hrubého lyzátu buněk s přídavkem RNázy A.

### 5.3.3 Grafické porovnání izolací DNA pomocí Fkol 135ox a FH 46ox

Byly porovnávány koncentrace DNA izolované mikročásticemi Fkol 135ox a FH 46ox ze 100  $\mu$ l hrubých lyzátů buněk s přidavkem RNázy A a bez přidavku RNázy A. Koncentrace DNA izolované pomocí obou magnetických nosičů byly vyneseny do Grafu 3.

*Graf 3: Porovnání koncentrací DNA izolované ze 100  $\mu$ l hrubých lyzátů buněk pomocí magnetických nosičů FH 46ox a Fkol 135ox.*



+ V hrubém lyzátu buněk byla enzymaticky degradována RNA  
 - V hrubém lyzátu buněk nebyla enzymaticky degradována RNA

→ Větší množství DNA bylo izolováno pomocí mikročástic Fkol 135ox než pomocí mikročástic FH 46ox. Z hrubých lyzátů buněk bez přidavku RNázy A bylo izolováno větší množství DNA než za použití hrubých lyzátů buněk s působením enzymu RNáza A.

### 5.4 Porovnání použitých metod izolace DNA

V Tabulce 16 jsou porovnány metody (fenolová extrakce, mikročástice) použité při izolaci DNA ze 100  $\mu$ l hrubého lyzátu buněk.

*Tabulka 16: Porovnání metod izolací DNA*

Metoda izolace	Fenolová extrakce				Fkol 135ox				FH 46ox	
Objem kultury [ml]	1		3		1		3		1	
RNáza A [100 $\mu$ g/ml]	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
Lyzát b. [ $\mu$ l]	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Eluce doTE pufru [ $\mu$ l]	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
Koncentrace DNA [ng/ $\mu$ l]	44,5	62	136	173	10	11,5	34	75,5	2,5	13,5
Hmotnost DNA [ $\mu$ g]	2,225	3,100	6,800	8,650	0,500	0,575	1,700	3,775	0,125	0,675

- + v hrubém lyzátu buněk byla enzymaticky degradována RNA
- v hrubém lyzátu buněk nebyla enzymaticky degradována RNA

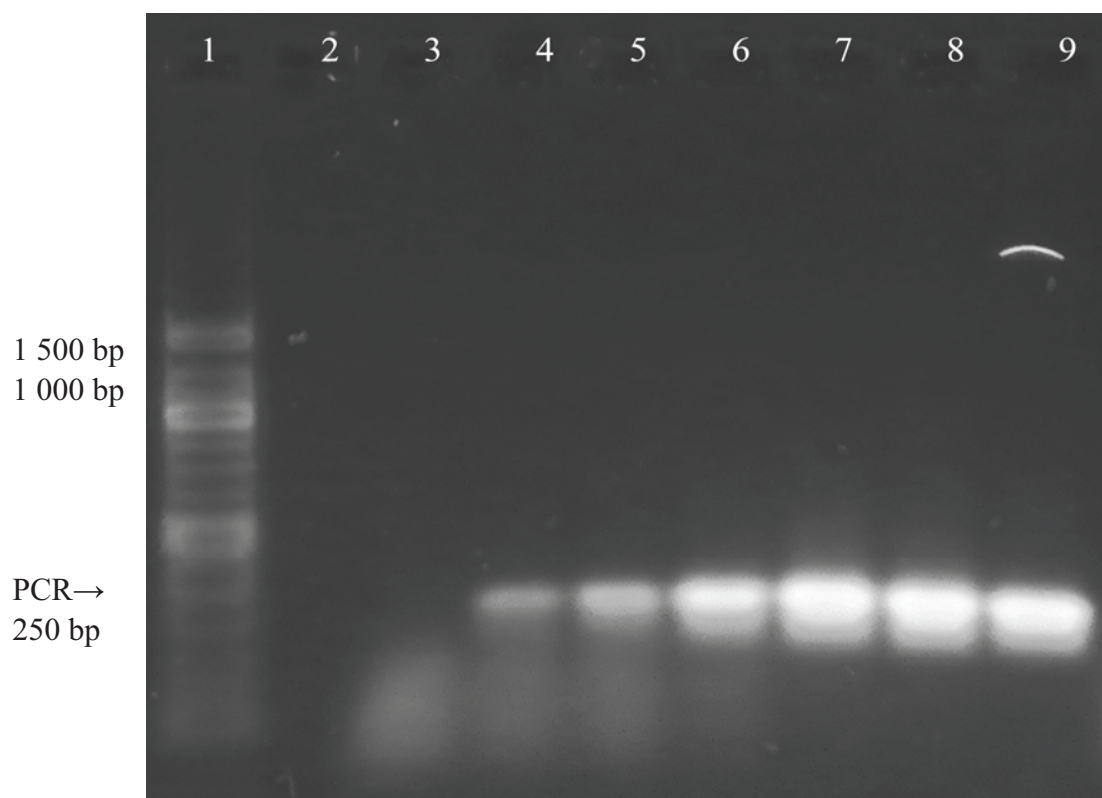
Množství izolované DNA u fenolové extrakce je závislé na množství použité bakteriální kultury pro přípravu hrubých lyzátů buněk. Z hrubých lyzátů buněk bez přídavku RNázy A bylo izolováno větší množství DNA.

U metody izolace DNA za použití magnetických mikročástic je rozdíl v množství izolovaném z hrubých lyzátů buněk s nedegradovanou a degradovanou RNA. Větší množství nukleových kyselin, než při použití hrubých lyzátů buněk bez degradace RNA.

### 5.5 Citlivost metody PCR pro rod *Lactobacillus*

Citlivost metody PCR byla ověřena podle postupu z kapitoly 4.2.9. Citlivost byla ověřena pro primery na rod *Lactobacillus*. Výsledky z detekce amplikonů jsou uvedeny na Obrázku 9.

Obrázek 9: Agarózová gelová elektroforéza DNA izolované z bakterií *Lactobacillus* (amplikon 250 bp).



Běh	DNA [ng]	Produkt PCR
1	Standard	100 bp žebříček
2	$10^{-6}$	-
3	$10^{-5}$	-
4	$10^{-4}$	+
5	$10^{-3}$	++
6	$10^{-2}$	+++
7	$10^{-1}$	+++
8	$10^1$	+++
9	10	+++

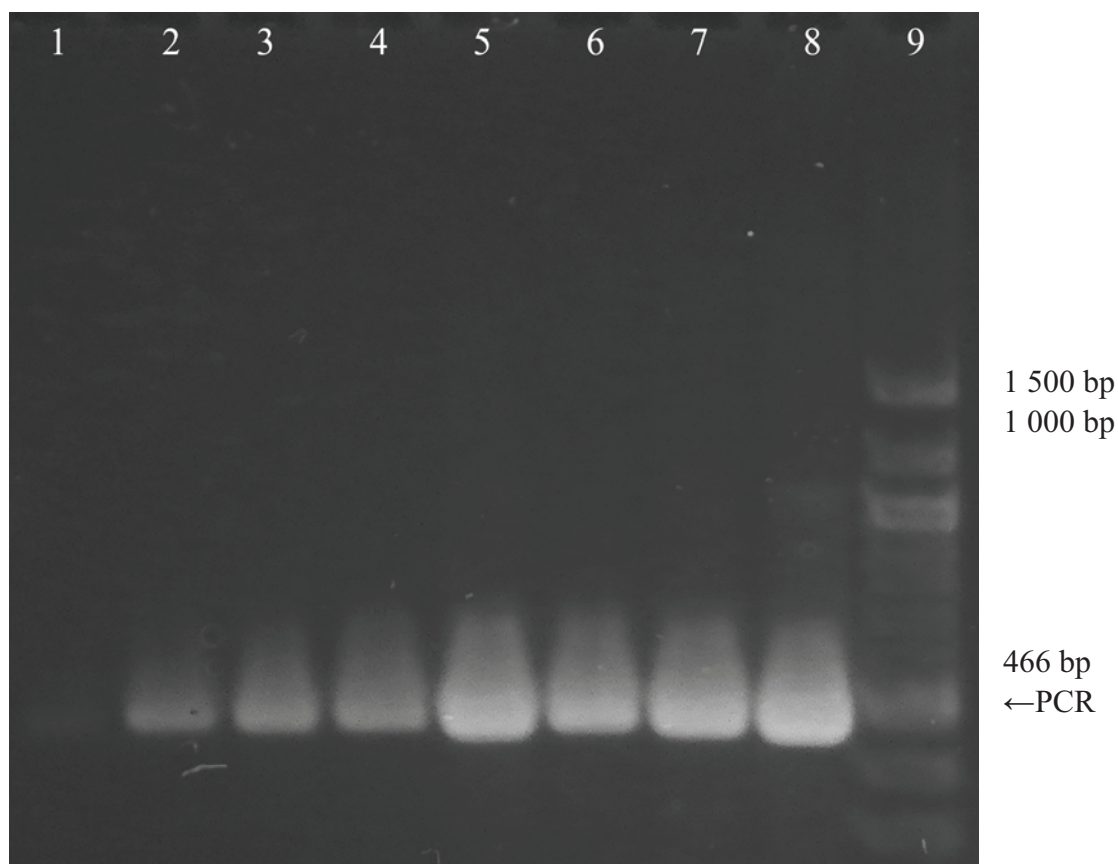
Amplifikováno bylo různé množství DNA s primery specifickými pro rod *Lactobacillus*.

→ PCR produkty byly detegovány po amplifikaci DNA metodou PCR. Nepřítomnost produktů PCR byla zaznamenána jen v případě velmi nízkých koncentrací. Ostatní pásy jsou jasně viditelné. Zjištěná citlivost byla  $10^{-4}$  ng/μl.

### 5.6 Citlivost metody PCR pro doménu *Bacteria*

Citlivost metody PCR byla ověřena podle postupu z kapitoly 4.2.9. Citlivost byla ověřena pro primery na doménu *Bacteria*. Výsledky z detekce amplikonů jsou uvedeny na Obrázku 10.

Obrázek 10: Agarózová gelová elektroforéza (amplikon 466 bp)



Běh	DNA [ng]	Produkt PCR
1	$10^{-6}$	+
2	$10^{-5}$	++
3	$10^{-4}$	++
4	$10^{-3}$	++
5	$10^{-2}$	+++
6	$10^{-1}$	+++
7	$10^1$	+++
8	10	+++
9	Standard	100 bp žebříček

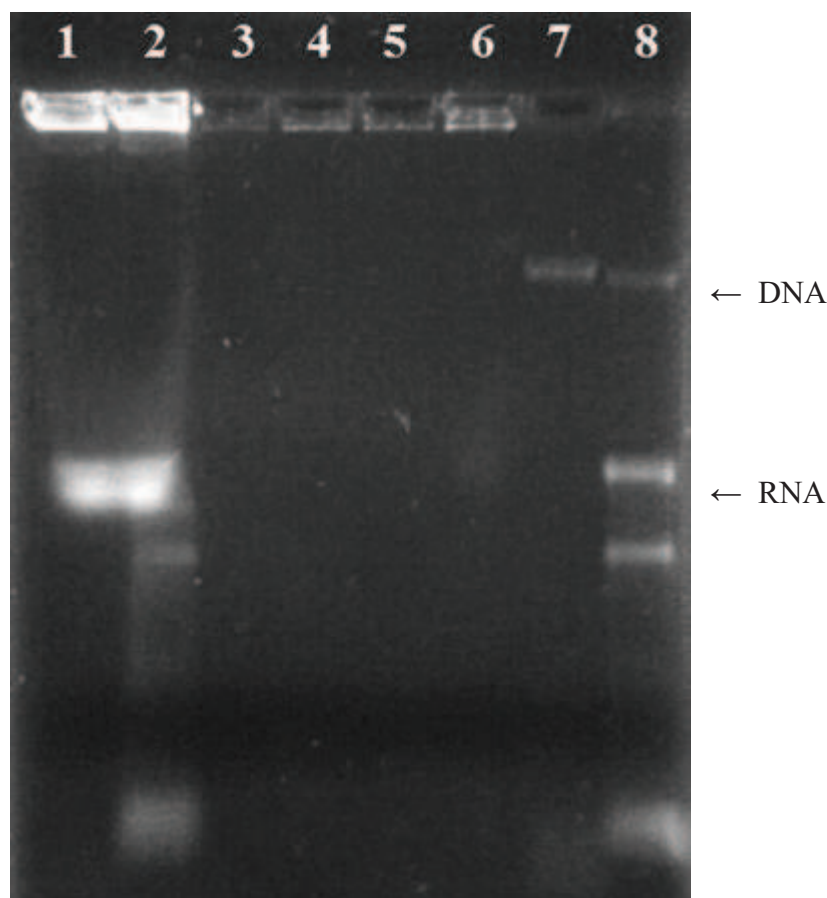
Amplifikováno bylo různé množství DNA s primery specifickými pro doménu *Bacteria*

→ PCR produkt byl detekován na gelu po provedení amplifikace. Produkty PCR jsou jasné patrné. Pro doménu *Bacteria* jsou produkty metody PCR silnější a bylo detekováno i limitní množství. Citlivost PCR metody pro doménu *Bacteria* je  $10^{-6}$  ng/μl.

### 5.7 Ověření izolace DNA pomocí agarózové gelové elektroforézy

Pro kontrolu kvality izolované DNA z obou metod byla využita separační metoda gelové elektroforézy. Na agarózový gel byly nanесeny vzorky z hrubého lyzátu bez přídavku RNázy A, hrubého lyzátu s přídavkem RNázy A, pro ověření úspěšné lyze buněk. DNA získané fenolovou extrakcí z obou druhů lyzátů a DNA izolovaná pomocí magnetických nosičů byla nanесena na gel (Obrázek 11).

Obrázek 11: Agarózová gelová elektroforéza DNA izolované metodou fenolové extrakce a magnetickým nosičem..



Běh	Nosič	RNáza A	DNA [ng/μl]	Detekce DNA
1	Hrubý lyzát	+		+
2	Hrubý lyzát	-		+
3	Fkol 135ox	+	10	+
4	Fkol 135ox	-	11,5	+
5	FH 46ox	+	11	+
6	FH 46ox	-	4,25	+
7	Fenolová extrakce	+	136	+
8	Fenolová extrakce	-	173	+

Na gel byla DNA nanášena v objemu 15 μl s 3 μl nanášecího pufru.

+ Detekce DNA nanesené na gel

→ Izolovaná DNA byla detegována. Vedle DNA byla detegována na gelu i RNA ve vzorcích bez přídavku RNázy A. V běhu č. 1 a 2 je patrná DNA uvolněná po lyzi buněk, v běhu č. 2 je viditelná stopa po RNA, která nebyla enzymaticky odbourána. Potvrzuje přítomnost DNA v hrubém lyzátu buněk. V běhu č. 3 – 6 byla slabě detegována DNA izolovaná pomocí magnetického nosiče.



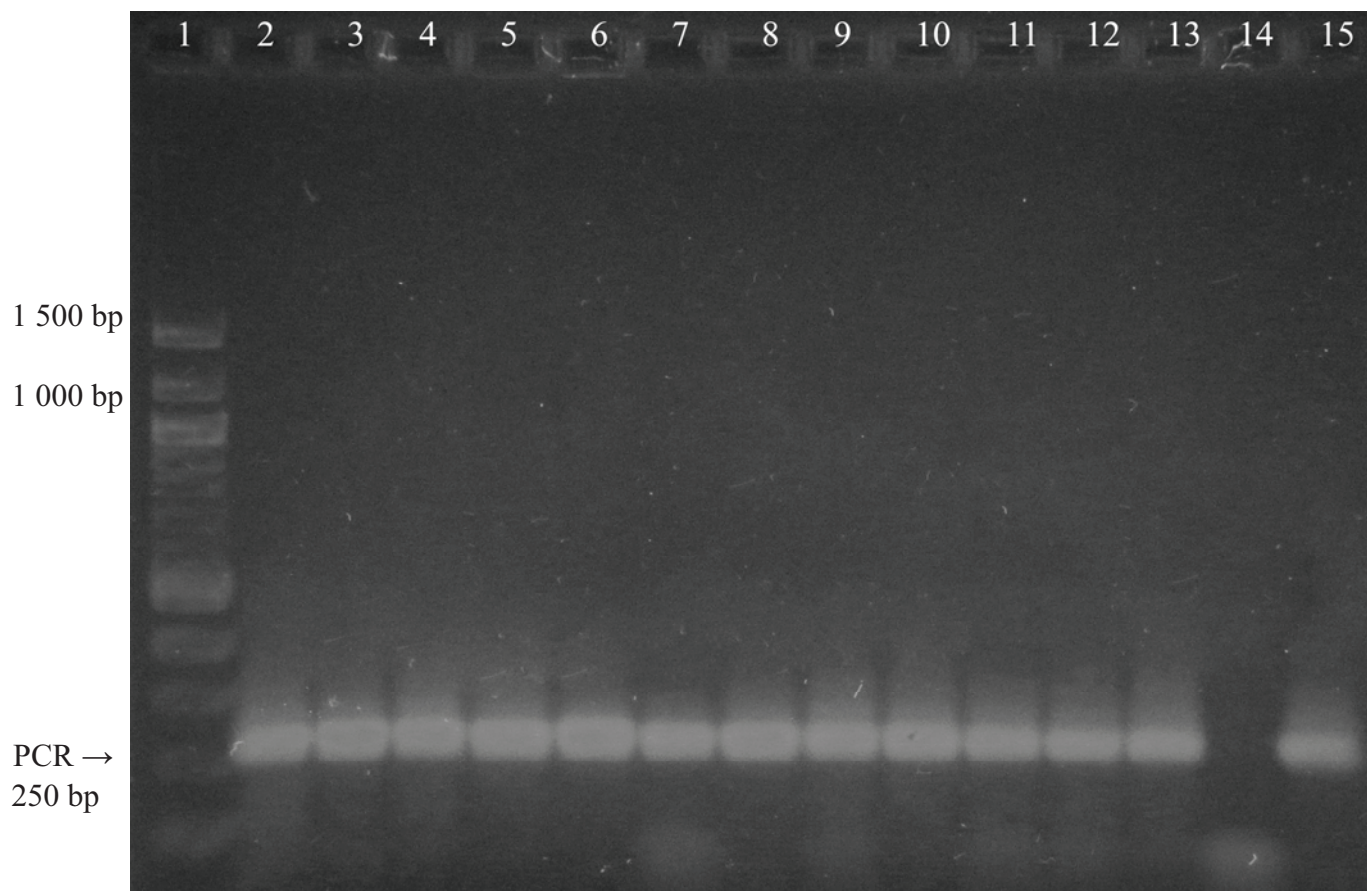
V běhu 7 a 8 je viditelná DNA izolovaná metodou fenolové extrakce. V běhu č. 8 je opět vizualizována stopa po RNA, která na rozdíl od běhu č. 7 nebyla enzymaticky odbouraná.

### 5.8 Ověření kvality izolované DNA metodou PCR pro rod *Lactobacillus*

Množství DNA izolované pomocí magnetických částic je velmi malé, proto je potřeba k potvrzení její přítomnosti využít metodu PCR. Po amplifikaci fragmentů DNA je možná jejich detekce na gelu.

Při provedení analýzy bylo postupováno podle návodu v kapitole 4.2.9 v části metody. Byly použity primery pro rod *Lactobacillus*. Agarózová gelová elektroforéza produktů PCR je uvedena na Obrázku 12.

Obrázek 12: Agarózová gelová elektroforéza amplikon.





Běh	Nosič	RNáza A	DNA ve směsi pro PCR [ng]	Produkt PCR
1	Standard		-	100 bp žebříček
2	FH 46ox	-	67,5	+
3	FH 46ox	+	12,5	+
4	Fkol 135ox	-	377,5	+
5	Fkol 135ox	+	170	+
6	FH 46ox	-	21,25	+
7	FH 46ox	+	55	+
8	Fkol 135ox	-	57,5	+
9	Fkol 135ox	+	50	+
10	FH 46ox	-	91,5	+
11	FH 46ox	+	15	+
12	Fkol 135ox	-	16,25	+
13	Fkol 135ox	+	30	+
14	NK		-	-
15	PK		50	+

Byla amplifikována DNA izolovaná magnetickými nosiči pomocí primerů pro rod *Lactobacillus*. Bylo amplifikováno 5 µl DNA. Na gel bylo naneseno 25 µl produktu PCR.

NK – negativní kontrola, místo matrice byl přidán 5 µl vody pro PCR.

PK – pozitivní kontrola, jako matrice byla použita DNA izolovaná metodou fenolové extrakce zředěná na 10 ng/µl

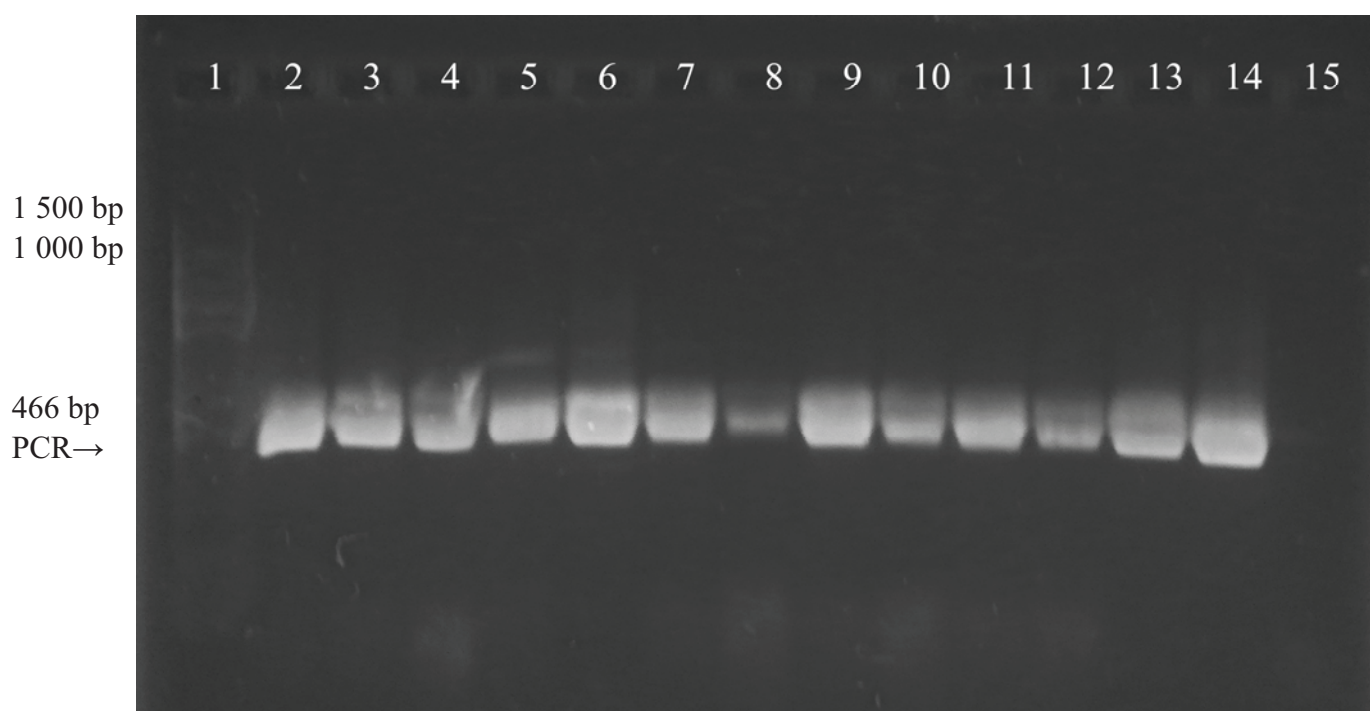
→ DNA izolovaná pomocí magnetického nosiče byla použita pro metodu PCR. Na gelu je viditelný PCR produkt, který má velikost specifickou pro rod *Lactobacillus* a to 250 bp. Některé bendy se projeví na gelu slaběji než jiné. Na gel bylo naneseno 25 µl vzorku. Podle standardního žebříčku byla potvrzena velikost amplikonů a tedy potvrzena přítomnost DNA rodu *Lactobacillus*. K amplifikaci DNA došlo u všech vzorků.

## 5.9 Ověření kvality izolované DNA metodou PCR pro doménu *Bacteria*

Množství DNA izolované pomocí magnetických částic je velmi malé, proto je potřeba k potvrzení její přítomnosti využít metodu PCR. Po amplifikaci fragmentů DNA je možná jejich detekce na gelu.

Při provedení analýzy bylo postupováno podle návodu v kapitole 4.2.9 v části metody. Byly použity primery pro doménu *Bacteria* a matrice DNA byla přidána v objemu 1 µl. Výsledky a zobrazení gelu jsou uvedeny níže na Obrázku 13.

Obrázek 13: Agarózová gelová elektroforéza (amplikon 466 bp),



Běh	Nosič	RNáza A	DNA ve směsi pro PCR [ng]	Produkt PCR
1	Standard		-	100bp žebříček
2	FH 46ox	-	13,5	+
3	FH 46ox	+	2,5	+
4	Fkol 135ox	-	75,5	+
5	Fkol 135ox	+	34,0	+
6	FH 46ox	-	4,3	+
7	FH 46ox	+	11,0	+
8	Fkol 135ox	-	11,5	+
9	Fkol 135ox	+	10,0	+
10	FH 46ox	-	18,3	+
11	FH 46ox	+	3,0	+
12	Fkol 135ox	-	3,3	+
13	Fkol 135ox	+	6,0	+
14	PK		10,0	+
15	NK		-	-

Byla amplifikována DNA izolovaná pomocí magnetického nosiče pomocí primerů pro doménu *Bacteria*. Amplifikován byl 1  $\mu$ l DNA. Na gel bylo nanášeno 25  $\mu$ l produktu PCR.

NK – negativní kontrola, místo matrice byl přidán 1  $\mu$ l PCR vody

PK – pozitivní kontrola, jako matrice byla použita DNA izolovaná metodou fenolové extrakce zředěná na 10 ng/ $\mu$ l

→ DNA izolovaná pomocí magnetického nosiče byla použita pro metodu PCR. Na gelu je viditelný PCR produkt, který má velikost specifickou pro doménu *Bacteria* a to 466 bp. Některé produkty se projeví na gelu slaběji než jiné, ovšem všechny jsou na gelu silně viditelné. Na gel bylo nanášeno 25 µl vzorku. Podle standardního žebříčku byla potvrzena velikost ampliconů a tedy potvrzena přítomnost DNA domény *Bacteria*. K amplifikaci DNA došlo u všech vzorků

### 5.10 Testování izolace DNA pomocí elektrostatických sil

Bylo testováno nejvhodnější pH pufru pro izolaci DNA pomocí mikročástic s  $-NH_2$  funkčními skupinami za využití elektrostatických sil. Pro adsorpci DNA byl testován pufr 10mM Tris – HCl o pH 7,0; 7,6; 8,0; 8,5. Použitá koncentrace magnetického nosiče byla 10 mg/ml. Směs DNA a nosiče byla připravena dle 4.2.7. Výchozí koncentrace DNA a koncentrace supernatantů po předpokládané vazbě DNA na mikročástice jsou uvedeny v Tabulkách 17 až 19.

*Tabulka 17 : Koncentrace DNA kuřecích erytrocytů*

pH pufru (10 mM Tris)	Koncentrace DNA [ng/µl]			Průměr koncentrací DNA [ng/µl]	Absorbance [nm]				
					230	260	280	320	260/280
7,0	258	259	260	259	0,23	0,52	0,29	0,01	1,84
7,6	317	308	310	312	0,27	0,62	0,34	0,01	1,83
8,0	363	362	360	362	0,33	0,74	0,41	0,01	1,81
8,5	451	456	457	455	0,42	0,92	0,52	0,01	1,78

→ Výchozí koncentrace DNA, která byla použita pro vazbu na nosič pomocí elektrostatických sil, byla 259 až 455 ng/µl.

*Tabulka 18 : Koncentrace DNA v supernatantu po adsorpci i DNA na nosič (první experiment)*

pH pufru	Koncentrace DNA v supernatantu [ng/µl]			Průměr koncentrací [ng/µl]	Absorbance [nm]				
					230	260	280	320	260/280
7,0	236	238	235	236	0,22	0,48	0,26	0,01	1,84
7,6	293	293	291	292	0,26	0,59	0,32	0,01	1,84
8,0	349	351	350	350	0,31	0,70	0,39	0,01	1,84
8,5	456	454	453	454	0,41	0,91	0,50	0,01	1,85

→ Koncentrace DNA, která byla naměřena v supernatantu po předpokládané vazbě části nukleových kyselin na mikročástice při prvním provedení pokusu.

*Tabulka 19 : Koncentrace DNA v supernatantu po předpokládané sorpci části DNA na nosič (druhý experiment)*

pH pufru	Koncentrace DNA v supernatantu [ng/μl]			Průměr koncentrací [ng/μl]	Absorbance [nm]				
					230	260	280	320	260/280
7,0	248	243	245	245	0,24	0,52	0,29	0,01	1,84
7,6	308	306	307	307	0,33	0,62	0,34	0,01	1,86
8,0	361	360	360	360	0,36	0,77	0,42	0,01	1,85
8,5	450	450	450	450	0,41	0,92	0,50	0,01	1,85

→ Koncentrace DNA, která byla naměřena v supernatantu po předpokládané vazbě části nukleových kyselin na mikročástice při druhém provedení pokusu.

#### 5.10.1 Množství DNA navázané pomocí elektrostatických sil

Pro zjištění množství navázaných nukleových kyselin na nosič, byly výchozí koncentrace DNA a koncentrace DNA v supernatantu od sebe odečteny. Výsledné hodnoty z prvního experimentu jsou uvedeny v Tabulce 20 a výsledné hodnoty z druhého experimentu jsou uvedeny v Tabulce 21. Rozdíly byly vyneseny do Grafu 4.

*Tabulka 20: Množství DNA adsorbované na nosič (první experiment)*

pH pufru	Výchozí koncentrace DNA [ng/μl]	Koncentrace DNA v supernatantu [ng/μl]	Rozdíl koncentrací [ng/μl]	Rozdíl koncentrací [%]
7,0	259	236	23	8,9
7,6	312	292	20	6,4
8,0	362	350	12	3,3
8,5	455	454	1	0,2

→ Část nukleových kyselin byla navázána pomocí elektrostatických sil na mikročástice v prostředí 10 mM Tris – HCl o pH 7,0 a 7,6.

*Tabulka 21: Množství DNA adsorbované na nosič (2. experiment)*

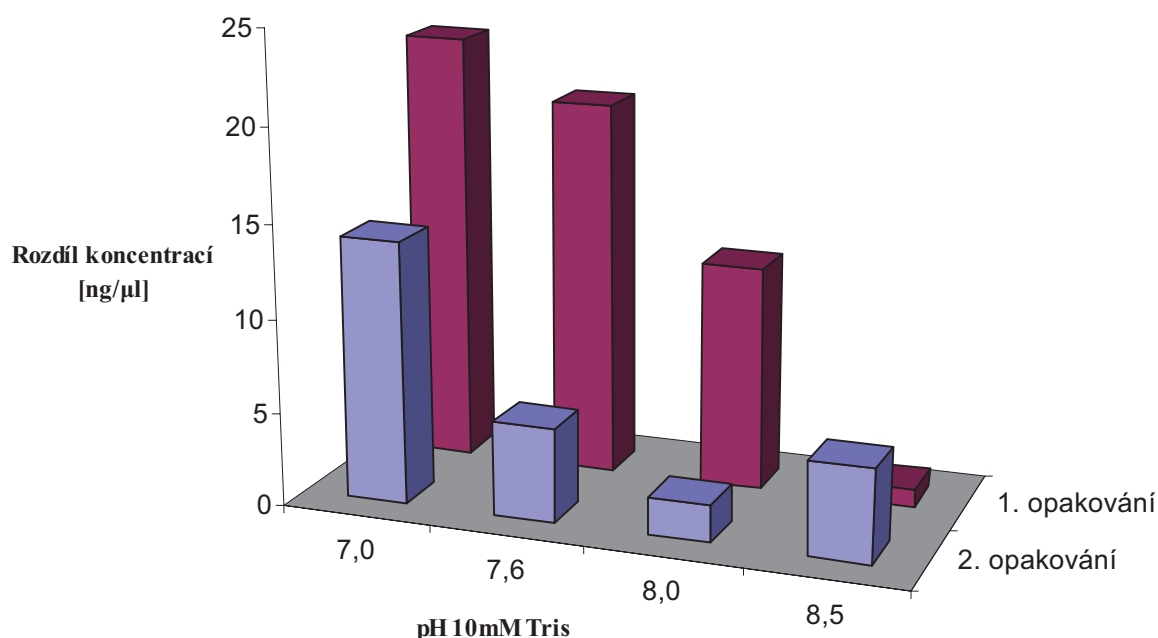
pH pufru	Výchozí koncentrace DNA [ng/μl]	Koncentrace DNA v supernatantu [ng/μl]	Rozdíl koncentrací [ng/μl]	Rozdíl koncentrací [%]
7,0	259	245	14	5,4
7,6	312	307	5	1,6
8,0	362	360	2	0,6
8,5	455	450	5	1,1

→ Část nukleových kyselin byla navázána pomocí elektrostatických sil na mikročástice v prostředí 10 mM Tris – HCl o pH 7,0.

#### 5.10.1.1 Grafické porovnání množství navázané DNA na nosič

Množství DNA navázané na nosiče s funkční skupinou  $\text{-NH}_2$  v prostředí 10 mM Tris – HCl o různém pH.

*Graf 4 : Porovnání rozdílů koncentrací pro různé hodnoty pH 10mM Tris – HCl pro izolaci DNA pomocí magnetických mikročástic s  $\text{-NH}_2$  skupinou*



Byly srovnány výsledné rozdíly koncentrací pufru, využívaného jako prostředí pro izolaci DNA za pomoci elektrostatických sil.

→ Pufr (10 mM Tris – HCl) o nejnižším pH je nejvýhodnější pro izolaci nukleových kyselin ze vzorku.

#### 5.10.2 Eluce DNA izolované pomocí elektrostatických sil

Eluce z nosiče s funkční skupinou  $\text{-NH}_2$  probíhala v prostředí TE pufru o pH 9,0. Koncentrace eluované DNA nebyla spektrofotometricky měřitelná. Pravděpodobně nedocházelo k dostatečnému uvolnění vazby DNA na nosič.

## 6 DISKUSE

### 6.1 Izolace DNA metodou fenolové extrakce

Jako kontrola pro izolaci bakteriální DNA magnetickým nosičem byla zvolena klasická metoda izolace fenolovou extrakcí. DNA izolovaná metodou fenolové extrakce vykazovala u některých vzorků po spektrometrickém měření čistoty indikaci znečištění fenolem. Na tuto skutečnost ukazují hodnoty absorbance hlavně u vzorku č. 2 při druhé izolaci. Absorbance při vlnové délce 230 nm je zvýšená.

Čistota DNA prezentovaná hodnotou  $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$  ukazuje znečištění RNA. Tento jev lze vysvětlit tím, že RNA, i když je degradovaná, absorbuje světlo stejné vlnové délky jako DNA. Není zásadní rozdíl v množství izolované DNA při použití hrubých lyzátů buněk s enzymaticky degradovanou RNA a hrubých lyzátů buněk bez degradace RNA enzymem RNáza A. Vliv na množství izolované DNA metodou fenolové extrakce má množství bakteriální kultury použité pro přípravě hrubých lyzátů buněk. Můžeme předpokládat, že pokud dojde k lyzi více bakteriálních buněk, dojde také k uvolnění většího množství DNA a tedy lze izolovat DNA ve vyšší koncentraci.

### 6.2 Izolaci DNA magnetickým nosičem

Množství DNA izolované pomocí magnetických nosičů, bylo podstatně nižší, než při izolaci fenolovou extrakcí. Z použitých dvou druhů nosičů, vychází pro izolaci výhodněji nosič s označením Fkol 135ox. Má na své povrchu více funkčních skupin, takže předpoklad odpovídá výsledku.

Celková DNA byla izolována v relativně menším množství, ale v kvalitě vhodné pro PCR. Kontaminace proteiny mohla být způsobena ulpěním částí buněk na nosičích nebo na stěnách zkumavky. Z důvodů nízkých hodnot absorbance jsou výsledné poměry nepřesné. Nemusí zde být indikované znečištění. Při experimentu byly použity stejné lyzáty buněk jako pro fenolovou extrakci.

#### 6.2.1 Izolace DNA magnetickým nosičem Fkol 135ox

Z grafického znázornění je patrná vysoká koncentrace DNA u první izolace za použití hrubého lyzátu buněk bez přídavku RNázy A. Celkově bylo izolováno více DNA z hrubých lyzátů buněk z enzymaticky nedegradovanou RNA.

#### 6.2.2 Izolace DNA magnetickým nosičem FH 46ox

Rozdíly mezi koncentracemi nejsou velké. Koncentrace nepřesahuje 20 ng/μl. Rozdíly v izolovaném množství mohly být způsobeny experimentálním uspořádáním. Nižší koncentrace jsou dány menším množstvím funkčních karboxylových skupin (-COOH) na povrchu nosiče, oproti nosiči s označením Fkol 135ox.

#### 6.2.3 Grafické srovnání izolací magnetickými nosiči

Pro názornost byly data z první izolace sloučena do jednoho grafu. Z celkového izolovaného množství DNA lze usuzovat, že pomocí magnetického nosiče Fkol 135ox bylo izolováno větší množství DNA. Množství použitého nosiče bylo u obou druhů stejné ( $c = 2 \text{ mg/ml}$ ). Vyšší množství izolované DNA lze zdůvodnit přítomností více funkčních karboxylových (-COOH) skupin na modifikovaném povrchu nosiče Fkol 135ox. Tím byl na

nosič navázán vyšší počet molekul DNA. Izolováno bylo více DNA při použití hrubých lyzátů buněk bez přídavku enzymu RNáza A.

#### **6.2.4 Vliv degradace RNA**

U fenolové extrakce bylo z hrubých lyzátů buněk s enzymaticky degradovanou RNA izolováno přibližně stejné množství DNA jako z hrubých lyzátů bez degradace RNA enzymem RNáza A. Tato metoda nebyla ovlivněna degradací RNA.

U metody využívající pro izolaci DNA magnetické mikročástice byl prokázán vliv degradace RNA na množství izolované DNA. Z experimentálně zjištěných dat lze vyvodit, že nedegradovaná RNA přítomná v hrubých lyzátech buněk měla pozitivní vliv na množství izolované DNA pomocí magnetických mikročástic. Z hrubých lyzátů buněk bez přídavku RNázy A bylo izolováno větší množství DNA než za použití hrubých lyzátů buněk ošetřených RNázou A.

Lze vyslovit následující hypotézu: nedegradovaná RNA a DNA se adsorbují na povrch nosiče, přičemž část nukleových kyselin se váže reversibilně a část irreversibilně. Při vyšší afinitě RNA k aktivním místům (nepokryté oxidy železa magnetického jádra), na kterých dochází k irreversibilní adsorpci, se větší podíl DNA pravděpodobně adsorbuje reversibilně. Na základě výše uvedené hypotézy lze předpokládat, že tato skutečnost umožňuje eluci většího množství DNA.

### **6.3 Porovnání metod izolace DNA**

Metoda izolace pomocí magnetického nosiče je méně invazivní než metoda fenolové extrakce. DNA izolovaná tímto způsobem je vhodná pro analýzu metodou PCR. Amplifikace probíhá většinou bez problémů. Inhibici, při provedení metody PCR s takto izolovanou DNA, mohou způsobit samotné magnetické částice, které v některých případech interferují a výsledky tak mohou být falešně negativní. Další nevýhodou je relativně nízká koncentrace DNA získaná tímto typem izolace vzhledem k vysoké citlivosti PCR to není na závadu.

#### **6.4 Citlivost metody PCR**

Při testování citlivosti metody PCR bylo zjištěno, že metoda je citlivější pro doménu *Bacteria*. Na gelu je čí vidět, že minimálního detegovatelné množství DNA ve vzorku bylo 1 fg/μl. Kdežto citlivost pro rod *Lactobacillus* byla 100 fg/μl při vysoké kvalitě DNA bylo detegovatelné množství i 10 fg/μl.

#### **6.5 Agarózová gelové elektroforéza DNA**

Výsledky ze všech tří opakování byly stejné, proto je zde uveden jen jeden příklad detekce DNA na gelu. Z gelu je patrné, že došlo k lyzi buněk a uvolnění DNA, která mohla být použita k izolaci (Obrázek 11). U běhu 7 a 8 je dobře rozeznatelná DNA izolovaná metodou fenolové extrakce. Izolovaná DNA je intaktní a tedy vhodná pro PCR. Dále je dobře pozorovatelný rozdíl při detekci DNA a RNA. V běhu 8 je viditelná přítomnost RNA na gelu, na rozdíl od běhu 7. Množství DNA izolované pomocí magnetického nosiče je tak malé, takže ho nelze detegovat na gelu. Kvalita izolované DNA byla ověřena u PCR - vzhledem k vysoké citlivosti PCR byla DNA detegována.



## 6.6 Agarózová gelová elektroforéza produktů PCR

Pro ověření přítomnosti specifické DNA byla použita metoda PCR. Pro amplifikaci byly použity specifické primery pro rod *Lactobacillus* (Obrázek 12) a pro doménu *Bacteria* (Obrázek 13).

Pro doménu *Bacteria* byla PCR metoda citlivější, proto jsou na gelu produkty PCR zřetelnější a silnější. Pro rod *Lactobacillus* metoda není tak citlivá, proto bylo množství DNA pro amplifikaci navýšeno (5 $\mu$ l). Přítomnost specifické DNA byla potvrzena ve všech vzorcích, proto lze konstatovat, že DNA byla izolována při použití obou magnetických nosičů v kvalitě vhodné pro PCR.

Na gelu jsou jasně viditelné PCR produkty, které mají specifickou délku pro rod *Lactobacillus* 250 bp a pro doménu *Bacteria* 466 bp.

Vyhodnocením gelu byla potvrzena přítomnost DNA rodu *Lactobacillus*.

## 6.7 Izolace DNA pomocí elektrostatických sil

Z prvních experimentálních dat lze usuzovat, že pro vazbu DNA na magnetickou mikročástici s povrchem pokrytým  $-NH_2$  skupinami, je vhodnější nižší pH reakčního pufru. Nejvíce DNA se vázalo při použití pufru o pH 7,0. K vazbě DNA na nosič u dalších testovaných pufrů s vyšším pH docházelo v menším množství. To je v souladu s předpokladem, že při nižším pH  $-NH_2$  skupiny, jimiž je nosič funkcionalizován, protonací vytvářejí kladný náboj, který je nezbytný pro reakci se záporně nabitou DNA [33].

## 7 ZÁVĚR

V práci byl zjišťován rozsah použití dvou magnetických mikročastic (Fkol 135ox a FH 46ox) funkcionalizovaných karboxylovými skupinami (-COOH) pro izolaci bakteriální DNA. Bylo zjištěno, že oba nosiče jsou vhodné pro izolaci bakteriální DNA z hrubých lyzátů buněk. Nosičem s označením Fkol 135ox bylo izolováno větší množství DNA. DNA izolovaná magnetickými mikročasticemi byla vhodná pro metodu PCR.

Sledován byl vliv degradace RNA, v hrubém lyzátu buněk za pomoci enzymu RNázy A, na množství izolované DNA. Bylo zjištěno, že RNA má vliv na vazbu DNA na nosič. Za použití hrubých lyzátů buněk bez přídavku enzymu RNáza A bylo izolováno větší množství nukleových kyselin, než za použití hrubých lyzátů buněk s enzymaticky degradovanou RNA.

Dále byl zkoumán proces adsorpce nukleových kyselin na magnetické mikročastice funkcionalizované amino skupinou (-NH<sub>2</sub>) při různém pH vazebného pufru. Bylo zjištěno, že pro izolaci DNA pomocí elektrostatických sil je výhodnější použití pufru s nižším pH.

Práce byla prezentována na dvou konferencích. Příspěvky jsou uvedeny v sekci přílohy.

## 8 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] ŠILHÁNKOVÁ, Ludmila. *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*. 3. oprav. a dopl. vyd. Praha: ACADEMIA, 2002, 363 s. ISBN 80-200-1024-6.
- [2] CAPLICE, E. Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. *International Journal of Food Microbiology*. roč. 50, 1-2, s. 131-149. ISSN 01681605.
- [3] MAXA, Věroslav a Vojtěch RADA. *Význam bifidobakterií a bakterií mléčného kvašení pro výživu a zdraví*. Vyd. 2. Praha: Ústav zemědělských a potravinářských informací, 2002, 42 s. ISBN 80-851-2057-7.
- [4] KAILASAPATHY, K. a S. RYBKA. The survival of culture bacteria in fresh and freeze-dried AB yoghurts. *The Australian Journal of Dairy Technology*. 1995, č. 40, s. 51-57.
- [5] SIDARENKA, A., G. NOVIK a V. AKIMOV. Application of Molecular Methods to Classification and Identification of Bacteria of the Genus Bifidobacteria. *Microbiology*. 2008, s. 251-260. ISSN 0026-2617.
- [6] MOMBELLI, Barbara a Maria Rita GISMONDO. The use of probiotics in medical practice. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2000, roč. 16, č. 4, s. 531-536. ISSN 09248579. DOI: 10.1016/S0924-8579(00)00322-8.
- [7] SAARELA, M., G. MOGENSEN, R. FONDÉN, J. MATTO a T. MATTILA. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *Journal of Biotechnology*. 2000, s. 197-215.
- [8] NEVORAL, J. Probiotika, prebiotika a synbiotika. *Pediatric pro praxi*. 2005, roč. 6, č. 2, s. 59-65. ISSN 1213-0494.
- [9] FOOKS, Laura J., Roy FULLER a Glenn R. GIBSON. Prebiotics, probiotics and human gut microbiology. *International Dairy Journal*. 1999, roč. 9, č. 1, s. 53-61. ISSN 09586946. DOI: 10.1016/S0958-6946(99)00044-8.
- [10] KRÁLOVÁ, B., L. FOUKAL, P. RAUCH a T. RUMML. *Bioanalytické metody*. 3., přeprac. vyd. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2001, 254 s. ISBN 80-708-0449-1.
- [11] Schéma průběhu PCR reakce. [online]. [cit. 2012-04-02]. Dostupné z: <http://accn.net/Bio/book/BearFlag45/Biology1A/LectureNotes/lec24.html>
- [12] WATSON, J. D. a F. H. C. CRICK. Molecular Structure of Nucleic Acids: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid. *Nature*. 1953-4-25, roč. 171, č. 4356, s. 737-738. ISSN 0028-0836. DOI: 10.1038/171737a0.

- [13] Amplifikace DNA pomocí polymerázové řetězové reakce. [online]. [cit. 2012-04-02]. Dostupné z: <http://biologie.upol.cz/metody/Amplifikace%20pomoci%20PCR.htm>
- [14] Nukleotidové báze. [online]. [cit. 2012-04-02]. Dostupné z: [http://orion.chemi.muni.cz/zakladni\\_pojmy\\_z\\_biochemie/page0191.htm](http://orion.chemi.muni.cz/zakladni_pojmy_z_biochemie/page0191.htm)
- [15] ROSSELLÓ-MORA, R. The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiology Reviews*. roč. 25, č. 1, s. 39-67. ISSN 01686445. DOI: 10.1016/S0168-6445(00)00040-1. Dostupné z: [http://doi.wiley.com/10.1016/S0168-6445\(00\)00040-1](http://doi.wiley.com/10.1016/S0168-6445(00)00040-1)
- [16] Termocykler. [online]. [cit. 2012-04-02]. Dostupné z: <http://www.dynex.cz/Termocyklery-ESCO>
- [17] Elektroforetické metody. [online]. [cit. 2012-04-02]. Dostupné z: [http://www.vscht.cz/ktk/www\\_324/lab/texty/cze/CZE.pdf](http://www.vscht.cz/ktk/www_324/lab/texty/cze/CZE.pdf)
- [18] RUMML, Tomáš. *Genové inženýrství*. 1. vyd. Praha: VŠCHT, 2002, 270 s. ISBN 80-708-0499-8.
- [19] ŠMARDKA, Jan. *Metody molekulární biologie*. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 2005, 188 s. ISBN 80-210-3841-1.
- [20] YAVUZ, Cafer T., Arjun PRAKASH, J.T. MAYO a Vicki L. COLVIN. Magnetic separations: From steel plants to biotechnology. *Chemical Engineering Science*. 2009, roč. 64, č. 10, s. 2510-2521. ISSN 00092509. DOI: 10.1016/j.ces.2008.11.018.
- [21] AGUILAR-ARTEAGA, K., J.A. RODRIGUEZ a E. BARRADO. Magnetic solids in analytical chemistry: A review. *Analytica Chimica Acta*. 2010-08-03, roč. 674, č. 2, s. 157-165. ISSN 00032670. DOI: 10.1016/j.aca.2010.06.043.
- [22] ŠÁLEK, P. *Příprava a charakterizace vysoce zesíťných polymerních nosičů*. Brno, 2010. Pojednání k dizertační práci.
- [23] HORÁK, D. a N. BENEDYK. Magnetic poly(glycidyl methacrylate) microspheres prepared by dispersion polymerization in the presence of electrostatically stabilized ferrofluids. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*. 2004-11-15, roč. 42, č. 22, s. 5827-5837. ISSN 0887-624x. DOI: 10.1002/pola.20406.
- [24] MA, Zhiya a Huizhou LIU. Synthesis and surface modification of magnetic particles for application in biotechnology and biomedicine. *China Particuology*. 2007, roč. 5, 1-2, s. 1-10. ISSN 16722515. DOI: 10.1016/j.cpart.2006.11.001.
- [25] MCBAIN, S. C., H. P. YIU a J. DOBSON. Magnetic nanoparticles for gene and drug delivery. *International journal of nanomedicine*. 2008, roč. 3, č. 2, s. 169-180. ISSN 1176-9114.

- [26] HORÁK, D., M. BABIŠ, H. MACKOVÁ a M. J. BENEŠ. Preparation and properties of magnetic nano- and micro-sized particles for biological and environmental separations. *Journal of Separation Science*. 2007, roč. 30, č. 11, s. 1751-1772. ISSN 16159306. DOI: 10.1002/jssc.200700088.
- [27] RITTICH, B., A. ŠPANOVÁ, D. HORÁK, M.J. BENEŠ, L. KLESNILOVÁ, K. PETROVÁ. Isolation of microbial DNA by newly designed magnetic particles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2006, roč. 52, č. 2, s. 143-148. ISSN 09277765. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2006.04.012.
- [28] SUGIMOTO, T. Formation of uniform spherical magnetite particles by crystallization from ferrous hydroxide gels\*1. *Journal of Colloid and Interface Science*. 1980, roč. 74, č. 1, s. 227-243. ISSN 00219797. DOI: 10.1016/0021-9797(80)90187-3.
- [29] KHALAFALLA, S. a G. REIMERS. Preparation of dilution-stable aqueous magnetic fluids. *IEEE Transactions on Magnetics*. 1980, roč. 16, č. 2, s. 178-183. ISSN 0018-9464. DOI:10.1109/TMAG.1980.1060578.
- [30] PEČOVÁ, M., L. ZAJONCOVÁ, K. POLÁKOVÁ, J. ČUDA, M. ŠAFAŘÍKOVÁ, M. ŠEBELA a I. ŠAFAŘÍK. Biologicky aktivní látky imobilizované na magnetických nosičích a jejich v biochemii a biotechnologii. *Chemické listy*. 2011, č. 105, s. 524-530.
- [31] BERENSMEIER, Sonja. Magnetic particles for the separation and purification of nucleic acids. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2006-11-13, roč. 73, č. 3, s. 495-504. ISSN 0175-7598. DOI: 10.1007/s00253-006-0675-0.
- [32] TEIF, Vladimír B. a Klemen BOHINC. Condensed DNA: Condensing the concepts. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*. 2011, roč. 105, č. 3, s. 208-222. ISSN 00796107. DOI: 10.1016/j.pbiomolbio.2010.07.002.
- [33] POLLARD, Thomas D, William C EARNSHAW a Jennifer LIPPINCOTT-SCHWARTZ. *Cell biology*. 2nd ed. Philadelphia: Saunders/Elsevier, c2008, 905 s. ISBN 978-141-6022-558.
- [34] RAHMAN, Md. Mahbubor a Abdelhamid ELAISSARI. Temperature and magnetic dual responsive microparticles for DNA separation. *Separation and Purification Technology*. 2011, roč. 81, č. 3, s. 286-294. ISSN 13835866. DOI: 10.1016/j.seppur.2011.07.030.
- [35] ŠPANOVÁ, Alena a Bohuslav RITTICH. *Analýza vybraných druhů bakterií mléčého kvašení pomocí metod molekulární biologie*. Vyd. 1. Brno: Vysoké učení technické, Fakulta chemická, 2010, 86 s. ISBN 978-80-214-4004-3.
- [36] DUBERNET, S., N. DESMASURES a M. GUÉGUEN. A PCR-based method for identification of lactobacilli at the genus level. *FEMS Microbiology Letters*. 2002, s. 271-275.

[37] HAARMAN, M. a J. KNOL. Quantitative Real-Time PCR Analysis of Fecal Lactobacillus Species in Infants Receiving a Prebiotic Infant Formula. *Applied and Environmental Microbiology*. 2006-04-05, roč. 72, č. 4, s. 2359-2365. ISSN 0099-2240. DOI: 10.1128/AEM.72.4.2359-2365.2006.

## 9 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

BMK	bakterie mléčného kvašení
PCR	polymerázová řetězová reakce
RNA	ribonukleová kyselina
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dNTP	2'-deoxyribonukleotid-5'-trifosfát
EDMA	ethylendimethakryát
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
GMA	glycidylmethakrylát
HEMA	hydroxyethylmethakrylát
PEG	poly(ethylen glykol)
CCM	česká sbírka mikroorganismů z angl. Czech Collection of Microorganisms
SDS	dodecylsulfát sodný
A	adenin
T	thymin
G	guanin
C	cytosin
RT-PCR	reverzně transkripční polymerázová řetězová reakce
TBE	Tris-borát-EDTA
CIZ	chloroform-isoamylalkohol
P(HEMA-co-EDMA)	poly(hydroxyethylmethakrylát-co-ethylendimethakrylát)
P(HEMA-co-GMA)	poly(hydroxyethylmethakrylát-co-glycidylmethakrylát)
T <sub>m</sub>	teplota tání (melt temperature)
PDI	index polydispersity
TE	Tris-EDTA
NK	negativní kontrola
PK	pozitivní kontrola



## 10 PŘÍLOHY

Práce byla prezentována na konferencích:

Odborná konference výživa, potraviny a zdravý životní styl. Brno 14.-15.4.2012

Studentská vědecká konference v Trnavě. Trnava 26.4.2012

HRUDÍKOVÁ, R.; ŠPANOVÁ, A.; RITTICH, B.: Využití magnetických mikročastic při izolaci bakteriální DNA. *Konference Výživa, potraviny a zdravý životní styl: Sborník příspěvků*. Brno: Nutriční Akademie, 2012. s. 29. ISBN: 978-80-87502-05-1.

HRUDÍKOVÁ, R.; ŠPANOVÁ, A.; RITTICH, B.: Využití magnetických mikročastic při izolaci bakteriální DNA. *Celoslovenská studentská vedecká konferencia Aplikované prírodné vedy: Zborník prác*. Trnava: Univerzita sv. Cyrila a Metoda v Trnave, 2012. ISBN: 978-80-8105-360-3

Příspěvky jsou uvedeny dále v přílohách.



## Konference Výživa, potraviny a zdravý životní styl. Conference Food, Nutrition and Healthy Life Style

### VYUŽITÍ MAGNETICKÝCH MIKROČÁSTIC PŘI IZOLACI BAKTERIÁLNÍ DNA

Hrudíková, R.<sup>1</sup>, Španová, A.<sup>1</sup>, Rittich, B.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>VUT Brno, Fakulta chemická, Purkyňova 118, 612 00 Brno, ČR, email: xchrudikova@fch.vutbr.cz

Molekulárně diagnostické metody jsou používány ke kontrole zdravotní a hygienické nezávadnosti potravin. K izolaci DNA ve vhodné kvalitě se používá fenolová extrakce ve které se používají toxické látky fenol a chloroform. Trendem posledních let se stal výzkum nových alternativních metod izolace DNA bez použití uvedených látek. Jednou z takových metod je izolace DNA s použitím magnetických nosičů. Metoda umožňuje izolovat DNA v kvalitě vhodné pro molekulární diagnostiku z komplexních vzorků potravin.

Cílem této práce bylo testování vhodnosti použití dvou typů magnetických nosičů pro izolaci bakteriální DNA. Dále byl sledován vliv degradace RNA enzymem RNAsou A na množství izolované DNA. Byly použity magnetické hydrofilní nosiče na bázi HEMA: Fkol 135ox a FH 46ox (Makromolekulární ústav AV ČR, Praha). Tyto nosiče jsou na povrchu pokryté různým množstvím karboxylových skupin (-COOH). Izolace byla provedena z hrubých lyzátů buněk připravených z čisté kultury *Lactobacillus paracasei* RL-10, v prostředí 5M NaCl a 40% PEG 6000. Za uvedených podmínek dochází ke kondenzaci DNA a její adsorpci na povrch nosiče (Rittich a kol., 2009). V části hrubých lyzátů byla RNA enzymaticky degradována RNasou A (100 µg/ml). Kvalita izolované DNA byla ověřena pomocí PCR s primery LbLMA 1-rev; R16-1 (Dubernet a kol., 2002), specifickými pro rod *Lactobacillus*. Amplifikoval se produkt o velikosti 250 bp.

Z experimentálně zjištěných dat můžeme vyvodit následující závěry. RNA nemá vliv na množství DNA izolované pomocí magnetického nosiče. Koncentrace izolované DNA byly stejné a nebyly zaznamenány rozdíly při použití hrubého lyzátu s degradovanou RNA a nedegradovanou RNA. Množství izolované DNA naopak záleželo na použitých mikročásticích. Větší množství DNA bylo izolováno pomocí částic s větším obsahem -COOH skupin.

**Klíčová slova:** izolace bakteriální DNA, magnetické mikročástice, polymerázová řetězová reakce

Dubernet S, Desmasures N, Guéguen M.: *FEMS Microbiol. Lett.* 214, pp. 271-275 (2002)

Rittich B., Španová A., Šálek P., Němcová P., Trachtová Š., Horák D.: *J. Magn. Magn. Mat.* 321, pp. 1667-1670 (2009).

# VYUŽITÍ MAGNETICKÝCH MIKROČÁSTIC PŘI IZOLACI BAKTERIÁLNÍ DNA

Hrudíková, R., Španová, A., Rittich, B.

VUT Brno, Fakulta chemická, Purkyňova 118, 612 00 Brno, ČR, email:  
xchrudikova@fch.vutbr.cz

---

## Abstrakt:

Trendem posledních let se stal výzkum nových alternativních metod izolace DNA. Jednou z takových metod je izolace DNA s použitím magnetických nosičů. Metoda umožňuje izolovat DNA v kvalitě vhodné pro DNA diagnostiku z komplexních vzorků potravin. V práci byly testovány dva typy magnetických hydrofilních nosičů na bázi HEMA: Fkol 135ox a FH 46ox (Ústav makromolekulární chemie AV ČR, Praha) pro izolaci bakteriální DNA z hrubých lyzátů buněk. Dále byl sledován vliv degradace RNA enzymem RNasou A na množství izolované DNA. Kvalita izolované DNA byla ověřena pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR) s primery specifickými pro rod *Lactobacillus*.

Z experimentálně zjištěných dat lze vyvodit, že nedegradovaná RNA měla vliv na množství DNA izolované pomocí magnetických nosičů. Množství izolované DNA záviselo také na použitých mikročásticích. Větší množství DNA bylo izolováno pomocí částic s větším obsahem -COOH skupin na povrchu.

## Klíčová slova:

izolace bakteriální DNA, degradace RNA, magnetické mikročástice, PCR

---

## 1. Úvod

Výživa je jedním z hlavních faktorů pro udržení dostatečné populace střevních mikroorganismů [1]. S růstem používání probiotických kultur v potravinářském a farmaceutickém průmyslu se zvyšuje význam jejich kontroly. K ověřování přítomnosti a množství cílových probiotických bakteriálních buněk ve výrobcích či farmaceutických preparátech se využívají metody analýzy DNA.

Cílem práce bylo ověření vhodnosti použití dvou typů magnetických nosičů, funkcionalizovaných -COOH skupinami, pro izolaci bakteriální DNA z hrubých lyzátů buněk probiotické kultury. V hrubém lyzátu buněk byl sledován vliv degradace RNA enzymem RNasou A.

## 2. Materiál a metody

Pro izolaci byly použity mikročástice Fkol 135ox a FH 46ox, pokryté na povrchu různým množstvím karboxylových skupin (-COOH) (2,61 mM/g resp. 0,85 mM/g) [2]. Izolace byla provedena z hrubých lyzátů buněk připravených z čisté kultury *Lactobacillus paracasei* RL-10. DNA byla izolována pomocí magnetických mikročástic v prostředí 2 M NaCl a 16 % PEG 6000 [3]. Složení separační směsi je uvedeno v Tabulce 1 [3]. Pro ověření přítomnosti a kvality izolované bakteriální DNA byla použita metoda polymerázové řetězové reakce (PCR). DNA byla amplifikována v PCR s primery LbLMA 1-rev a R16-1 specifickými pro rod *Lactobacillus* [4]. Směs pro PCR byla připravena z komponentů, které jsou uvedeny v Tabulce 2. Detekce produktů PCR byla provedena pomocí agarosové gelové elektroforézy po nabarvení ethidium bromidem. Vizualizace byla provedena na transiluminátoru v UV světle o vlnové délce  $\lambda = 305$  nm.

Tabulka 1: Komponenty separační směsi pro izolaci DNA magnetickým nosičem.

Krok	Komponenta	Objem [μl]
1	Voda	0
2	NaCl (5 M)	400
3	Hrubý lyzát buněk	100
4	PEG 6000 (40%)	400
5	Magnetický nosič (2 mg/ml)	100
Celkem		1000

Tabulka 2: Komponenty pro přípravu PCR směsi.

Komponenty	Objem [μl]
Voda pro PCR	19,0
Reakční pufr kompletní (10x koncentrovaný)	2,5
Směs dNTP (10mM)	0,5
Primer 1 (10 pmol/μl)	0,5
Primer 2 (10 pmol/μl)	0,5
<i>Taq</i> DNA-polymerasa (1U/μl)	1,0
Matrice DNA (10 ng/μl)	1,0
<b>Celkem</b>	<b>25,0</b>

### 3. Výsledky a diskuse

#### 3.1 Izolace DNA pomocí magnetického nosiče Fkol 135ox:

Pro izolaci DNA bylo použito 100 μl hrubého lyzátu buněk připraveného z různých množství bakteriální kultury (3 ml a 1 ml). Byl sledován vliv degradace RNA na množství izolované DNA. Naměřené hodnoty koncentrací DNA jsou uvedeny v Tabulce 3 a na Obr. 1.

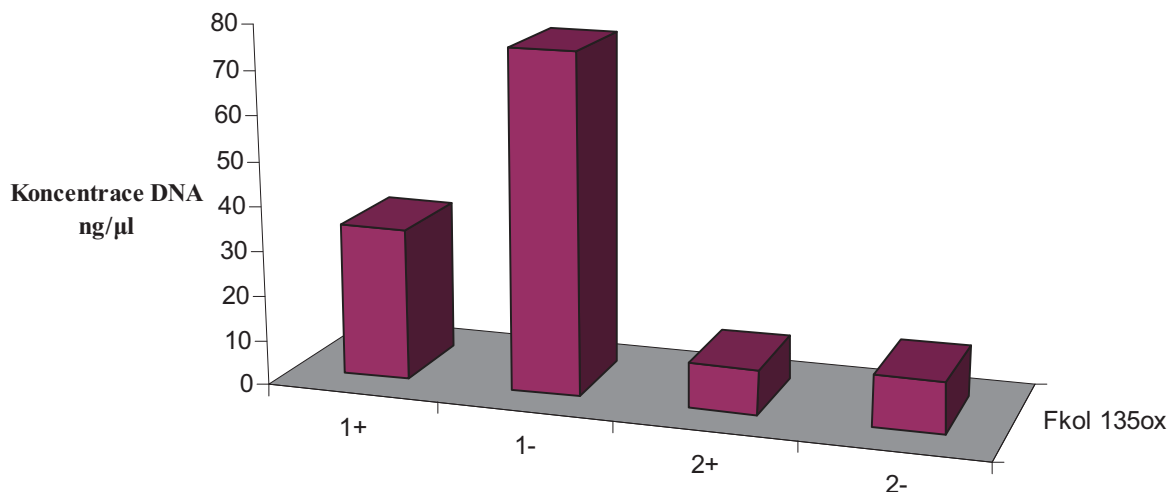
Tabulka 3: Hodnoty absorbancí DNA izolované magnetickým nosičem Fkol 135ox.

Nosič	Hrubý lyzát buněk			Izolovaná DNA		
	Objem kultury [ml]	RNasa A [0,1 μg]	Lyzát buněk [μl]	c [ng/μl]	TE pufr [μl]	DNA <sub>celková</sub> [ng]
Fkol 135ox	3	+	100	34,0	50	1 700
	3	-	100	75,5	50	3 775
	1	+	100	10,0	50	500
	1	-	100	11,5	50	575

+ degradovaná RNA

- nedegradovaná RNA

Obr. 1: Vliv degradace RNA RNasou A na koncentraci DNA izolované pomocí magnetického nosiče Fkol 135ox.



1 – hrubý lyzát buněk připravený ze 3 ml bakteriální kultury

2 – hrubý lyzát buněk připravený z 1 ml bakteriální kultury

+ degradovaná RNA

- nedegradovaná RNA

K izolaci DNA bylo použito 100 μl hrubého lyzátu buněk

- ✓ Vyšší koncentrace DNA byla izolována z hrubých lyzátů buněk připravených z většího množství bakteriální kultury a z hrubých lyzátů buněk bez přídavku RNázy A.

### 3.2 Izolace DNA pomocí magnetického nosiče FH 46ox:

Pro izolaci bylo použito 100 μl hrubého lyzátu buněk. Byl sledován vliv degradace RNA na množství izolované DNA. Naměřené hodnoty koncentrací DNA jsou uvedeny v tabulce č. 4 a v grafické podobě v grafu č. 2.

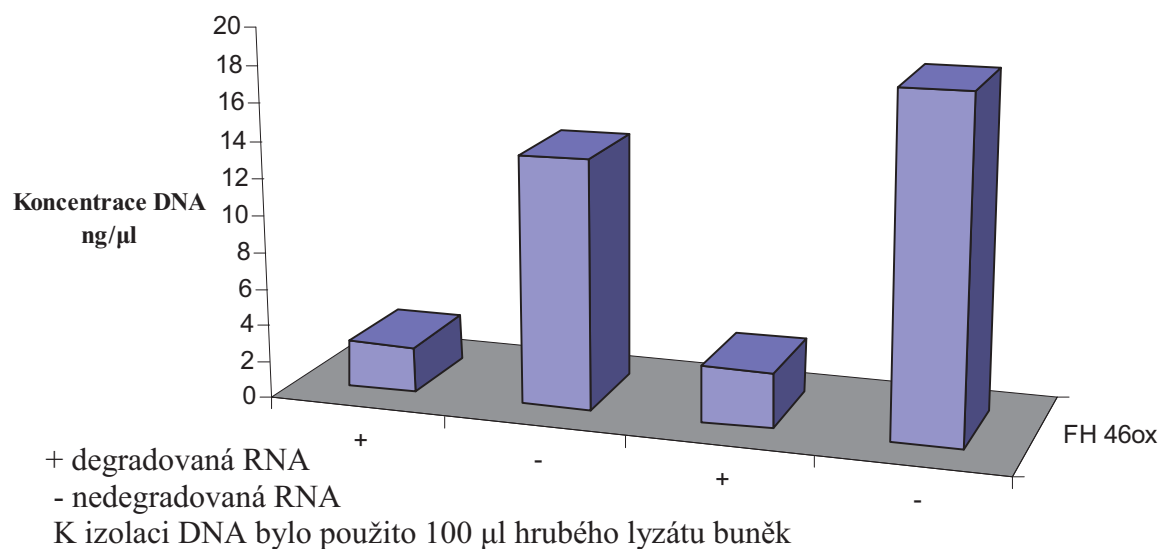
Tabulka 4: Hodnoty absorbancí DNA izolované magnetickým nosičem FH 46ox.

Nosič	Hrubý lyzát			Izolovaná DNA		
	Objem kultury [ml]	RNáza A [0,1 μg]	Lyzát buněk [μl]	c [ng/μl]	TE pufr [μl]	DNA <sub>celková</sub> [ng]
FH 46ox	1	+	100	2,5	50	125
	1	-	100	13,5	50	675
	1	+	100	3	50	150
	1	-	100	18,3	50	915

+ degradovaná RNA

- nedegradovaná RNA

Obr. 2: Vliv degradace RNA RNasou A na koncentraci DNA izolované pomocí magnetického nosiče FH 46ox.

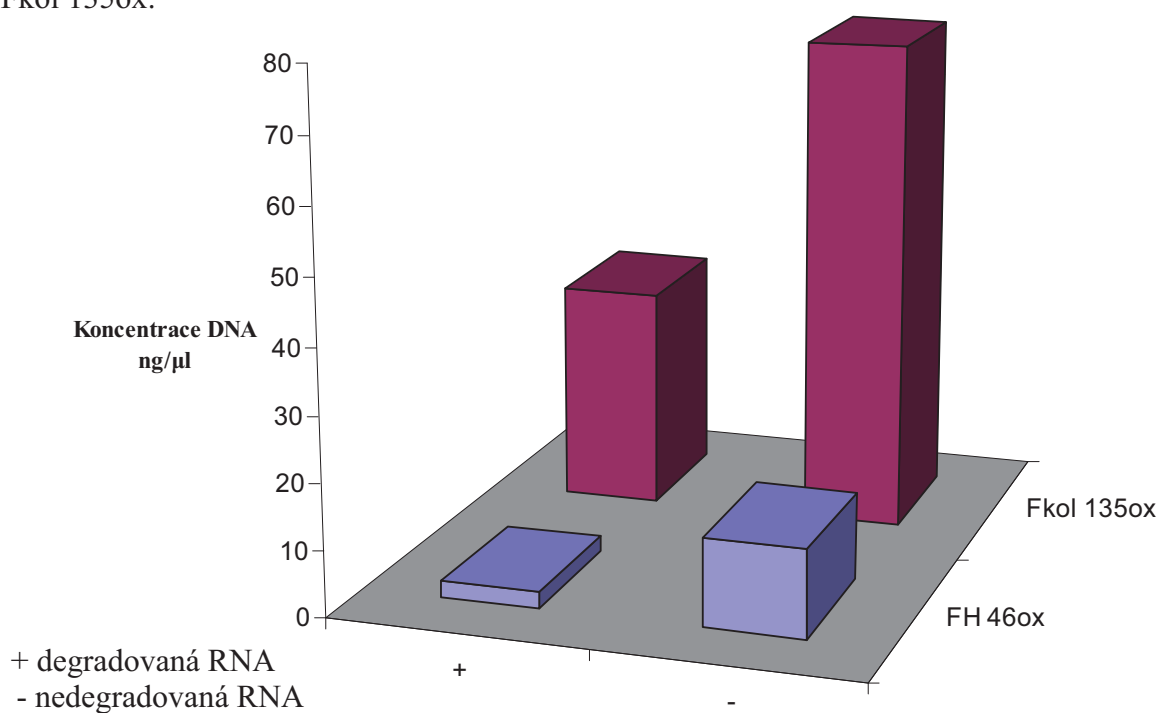


✓ Vyšší koncentrace DNA byly izolovány z hrubých lyzátů buněk bez přídavku RNasy A.

### 3.3 Porovnání izolace DNA pomocí magnetických nosičů Fkol 135ox a FH 46ox:

Byly porovnány koncentrace DNA izolované testovanými nosiči ze 100 μl hrubých lyzátů buněk s přídavkem RNasy A a bez přídavku RNasy A. Výsledky jsou uvedeny na Obr. 3.

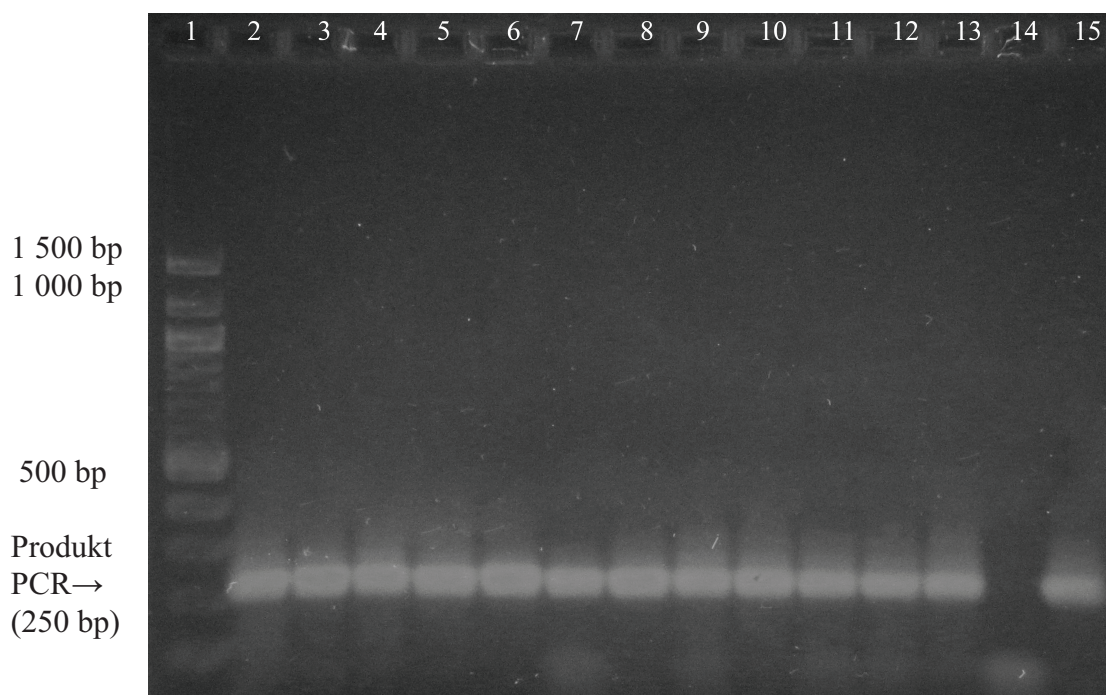
Obr. 3: Porovnání koncentrací DNA izolovaných pomocí magnetických nosičů FH 46ox a Fkol 135ox.



### 3.4 Ověření kvality DNA metodou PCR pro rod *Lactobacillus*:

Pro PCR byly použity primery specifické pro rod *Lactobacillus* a 5 $\mu$ l DNA [5]. Agarosová gelová elektroforéza produktů PCR je uvedena na Obr. 4.

Obr. 4: Agarosová gelová elektroforéza produktů PCR specifických pro rod *Lactobacillus* (250 bp).



Běh	Nosič	RNasa A	PCR produkt
1	Standard		100bp žebříček
2	FH 46ox	-	+
3	FH 46ox	+	+
4	Fkol 135ox	-	+
5	Fkol 135ox	+	+
6	FH 46ox	-	+
7	FH 46ox	+	+
8	Fkol 135ox	-	+
9	Fkol 135ox	+	+
10	FH 46ox	-	+
11	FH 46ox	+	+
12	Fkol 135ox	-	+
13	Fkol 135ox	+	+
14	NK		-
15	PK		+

NK – negativní kontrola, místo matrice bylo přidáno 5  $\mu$ l vody pro PCR

PK – pozitivní kontrola, jako matrice byla použita DNA (*Lactobacillus acidophilus*) izolovaná metodou fenolové extrakce (10 ng/ $\mu$ l)

Amplifikována byla DNA (5  $\mu$ l) izolována magnetickými nosiči. Na gel bylo nanášeno 25  $\mu$ l produktu PCR



- ✓ K amplifikaci a detekci specifických PCR produktů došlo u všech vzorků analyzované DNA. Velikost amplikonů byla 250 bp.

#### 4. Diskuse

Větší množství DNA bylo izolováno pomocí mikročastic Fkol 135ox (s vyšší koncentrací karboxylových skupin), než pomocí mikročastic FH 46ox. Z experimentálně zjištěných dat lze vyvodit, že nedegradovaná RNA přítomná v hrubých lyzátech buněk měla pozitivní vliv na množství izolované DNA pomocí magnetických mikročastic. Z hrubých lyzátů buněk bez přídavku RNasy A bylo izolováno větší množství DNA než za použití hrubých lyzátů buněk ošetřených RNasou A. Nedegradovaná RNA a DNA se adsorbují na povrch nosiče, přičemž část nukleových kyselin se váže reversibilně a část irreversibilně. Při vyšší afinitě RNA k aktivním místům (nepokryté oxidy železa magnetického jádra), na kterých dochází k irreversibilní adsorpci, se větší podíl DNA pravděpodobně adsorbuje reversibilně. Na základě výše uvedené hypotézy lze předpokládat, že tato skutečnost umožňuje eluci většího množství DNA.

#### 5. Závěr

Oba typy testovaných mikročastic jsou vhodné pro izolaci DNA v kvalitě vhodné pro PCR.

#### 6. Literatura

- [1] Mombelli, B.; Gismondo, M. R.: The use of probiotics in medical practice. *Int.l J.f Antimicrobial Agents*. 2000, 16, 531-536.
- [2] Horák, D., Benedyk, N.: Magnetic poly(glycidyl methacrylate) microspheres prepared by dispersion polymerization in the presence of electrostatically stabilized ferrofluids. *Journal of Polymer Science Polymer Physics Edition*, 2004, 5827-5837.
- [3] Španová, A., Rittich, B.: *Analýza vybraných druhů bakterií mléčného kvašení pomocí metod molekulární biologie*. 1. vyd. Brno: Vysoké učení technické, Fakulta chemická, 2010. 98 s. ISBN 978-80-214-4004-3
- [4] Rittich B., Španová A., Šálek P., Němcová P., Trachtová Š., Horák D.: *J. Magn. Magn. Mat.* 2009, 321, 1667-1670.
- [5] Dubernet S., Desmasures N., Guéguen M.: A PCR-based method for identification of lactobacilli at the genus level. *FEMS Microbiol. Letters*. 2002, 214, 271-275.